

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU RÉCEPTEUR DE TYPE 2 DE
L'ANGIOTENSINE II PAR LA MÉTHODE DU MARQUAGE PAR
PHOTOAFFINITÉ**

par

Guy Servant

Département de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade
Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Août 1996



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21863-5

À mon épouse Marylène

À mes parents Sylvaine et Arthur

À mes frères Marc, Paul et leurs épouses

pour leur appui, leur compréhension

et surtout leur amour....

RÉSUMÉ

Caractérisation biochimique du récepteur de type 2 de l'angiotensine II par la méthode du marquage par photoaffinité

par

Guy Servant

Département de Pharmacologie
Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade
Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Afin d'isoler le récepteur AT₂ et d'identifier ainsi quelques unes de ses propriétés biochimiques, nous avons utilisé l'approche du marquage par photoaffinité. Pour ce faire, nous avons développé un analogue photosensible de l'angiotensine II (AngII) le [Sar¹, Val⁵, p-benzoylPhe⁸]AngII (AngII-Bpa⁸). Cet analogue reconnaît le récepteur AT₂ avec une forte affinité (IC₅₀ de 0.3 nM). A l'aide de l'analogue radioiodé (¹²⁵I-AngII-Bpa⁸), nous avons photomarké avec un rendement élevé (70%) et spécifiquement le récepteur AT₂ du myomètre humain. L'analyse des complexes covalents par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a révélé une bande radioactive correspondant à une protéine de masse moléculaire apparente (M_r) de 68 kDa. Par la même approche nous avons marqué le récepteur AT₂ des lignées cellulaires PC-12 et Swiss 3T3. L'analyse de ces complexes covalents par SDS-PAGE a révélé des M_r de 140 kDa et 90 kDa chez les cellules PC-12 et Swiss 3T3 respectivement. La déglycosylation du récepteur AT₂ du myomètre humain et des cellules PC-12 et Swiss 3T3 a significativement diminué les M_r jusqu'à une valeur de 31 kDa. De plus, des études de cinétiques de déglycosylation ont démontré une baisse graduelle de la M_r en trois étapes, suggérant ainsi la présence d'au moins trois chaînes d'oligosaccharides sur le récepteur AT₂. En traitant les cellules PC-12 avec un bloqueur métabolique de la N-glycosylation, la tunicamycine, nous avons remarqué, suite au marquage des cellules, que ces dernières expriment à leur surface trois populations de récepteurs avec des M_r de 63 kDa, 47 kDa et 31 kDa. Par des expériences de chromatographie d'affinité sur lectine, nous avons observé que les populations à 63 kDa et 47 kDa correspondent à des formes partiellement glycosylées et que la population à 31 kDa correspond à la forme déglycosylée du récepteur AT₂. Des études de liaison effectuées sur les cellules PC-12 exprimant l'une ou l'autre de ces populations partiellement glycosylées ont révélé une baisse d'affinité d'un facteur deux pour l'AngII. Nous avons développé un autre analogue photosensible de l'AngII en modifiant la position 1 de la molécule par un résidu Bpa. Nous avons utilisé le ¹²⁵I-AngII-Bpa¹ et le ¹²⁵I-AngII-Bpa⁸ afin de définir les domaines de liaison du récepteur AT₂. Suite à différentes digestions enzymatiques et chimiques des complexes covalents, nous avons déterminé la taille des fragments obtenus et avons retracé leurs positions dans le récepteur. Les résultats démontrent que les positions 1 et 8 des analogues photoactivables interagissent respectivement avec le segment amino-terminal (résidus 2 à 30) et le troisième domaine transmembranaire (résidus 129 à 138) du récepteur AT₂. Ces résultats montrent que le récepteur AT₂ est une glycoprotéine possédant au moins trois chaînes d'oligosaccharides de types complexes. La variabilité de la M_r du récepteur AT₂, observée dans différents tissus, est due essentiellement à des degrés différents de N-glycosylation. La N-glycosylation du récepteur AT₂ a peu d'influence sur ses propriétés de liaison et n'est pas essentielle à son transport vers la membrane plasmique. Il est aussi proposé que le domaine de liaison du récepteur AT₂ est composé de résidus situés à la fois dans le segment amino-terminal extracellulaire et le troisième domaine transmembranaire.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES PUBLICATIONS	iv
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION	1
1. Le système rénine-angiotensine	1
2. Les récepteurs de l'angiotensine II.....	3
2.1. Le récepteur AT ₁	4
2.1.1. Structure.....	4
2.1.2. Mécanismes de transduction et fonctions.....	4
2.2. Le récepteur AT ₂	7
2.2.1. Distribution et caractérisation primaire des mécanismes de transduction.....	7
2.2.2. Structure.....	9
2.2.3. Aspects moléculaires et données biochimiques suggérant le couplage.....	10
2.2.4. Fonctions.....	11
3. Les glycoprotéines.....	13
3.1. Processus de N-glycosylation.....	14
3.2. Inhibiteurs du processus de N-glycosylation.....	20
3.3. Rôles de la N-glycosylation	24
3.3.1. Effets sur quelques paramètres physicochimiques	24
3.3.2. Effets sur la maturation et l'activité des glycoprotéines	25
4. Les domaines de liaison des récepteurs à 7DTM	29

4.1. Les domaines de liaison des agonistes	30
4.2. Les domaines de liaison des antagonistes.....	37
5. Justification de l'étude.....	40
RÉSULTATS.....	42
Article 1	
<i>Photoaffinity labeling of subtype 2 angiotensin receptor of human myometrium.....</i>	42
Article 2	
<i>The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N- glycosylation.....</i>	43
Article 3	
<i>Analysis of the role of N-glycosylation in cell-surface expression and binding properties of angiotensin II type 2 receptor of rat pheochromocytoma cells</i>	44
Article 4	
<i>Identification of angiotensin II binding domains in the rat AT2 receptor with photolabile angiotensin analogs</i>	45
DISCUSSION.....	46
CONCLUSION	60
REMERCIEMENTS.....	62
BIBLIOGRAPHIE.....	63

LISTE DES PUBLICATIONS

Pour cette thèse:

SERVANT, G., BOULAY, G., BOSSÉ, R., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. (1993) Photoaffinity labeling of subtype 2 angiotensin II receptor of human myometrium. *Mol. Pharmacol.* **43**: 677-683

SERVANT, G., DUDLEY, D.T., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. (1994) The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation. *Mol. Pharmacol.* **45**: 1112-1118

SERVANT, G., DUDLEY, D.T., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. (1996) Analysis of the role of N-glycosylation in cell surface expression and binding properties of angiotensin II type 2 receptor of rat pheochromocytoma cells. *Biochem. J.* **313**: 297-304

SERVANT, G., LAPORTE, S.A., LEDUC, R., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. Identification of angiotensin II binding domains in the rat AT₂ receptor with photolabile angiotensin II analogs. *J. Biol. Chem.* (accepté pour publication)

Autres travaux:

BOULAY, G., SERVANT, G., LUONG, T.-T., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. (1992) Modulation of angiotensin II binding affinity by allosteric interaction of polyvinyl sulfate with an intracellular domain of the DuP 753 sensitive angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa. *Mol Pharmacol.* **41**: 809-815

BOSSÉ, R., SERVANT, G., ZHOU, L.-M., BOULAY, G., GUILLEMETTE, G. & ESCHER, E. (1993) Sar¹-p-benzoylphenylalanine-angiotensin, a new photoaffinity probe for selective labeling of the type 2 angiotensin receptor. *Regul. Peptide* **44**: 215-223

SERVANT, G., BOSSÉ, R., GUILLEMETTE, G. & ESCHER, E. Selective photoaffinity labeling of type 2 receptors of angiotensin II. Dans R.S. Hodges & J.A. Smith (Eds): *Peptides*. Escom Sci. Publ., Leiden, The Netherlands (1994) p. 698-700

BOULEY, R., SERVANT, G., KLARSKOV, K., VAN BEEUMEN, J., INAGAMI, T. & ESCHER, E. Immunogen strategies for antibodies against type 2 angiotensin II receptor AT₂. Dans H.L.S. Maia (Ed): *Peptides*. Escom Sci. Publ., Leiden, The Netherlands (1994) p. 129-130

BERNIER, S.G., SERVANT, G., BOUDREAU, M., FOURNIER, A. & GUILLEMETTE, G. (1995) Characterization of a binding site for angiotensin IV on bovine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol. (Mol. Pharmacol. Sec.)* **291**: 191-200

LAPORTE, S.A., SERVANT, G., RICHARD, D.E., ESCHER, E., GUILLEMETTE, G. & LEDUC, R. (1996) The tyrosine within the NPX_nY motif of the human angiotensin II type 1 receptor is involved in mediating signal transduction but is not essential for internalization. *Mol. Pharmacol.* **49**: 89-95

BOULEY, R., GOSSELIN, M., PLANTE, H., SERVANT, G., PÉRODIN, J., ARCAND, M., GUILLEMETTE, G. & ESCHER, E. (1996) Characterization of a specific site for angiotensin II in chicken liver. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (soumis)

SERVANT G., ESCHER, E & GUILLEMETTE, G. (1996) The angiotensin II binding site on mycoplasma is structurally distinct from mammalian angiotensin II receptors. (en préparation)

SERVANT, G., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. (1996) The angiotensin AT₂ receptor: biochemical properties, structure, and evolving concepts on cellular functions and physiological roles. (en préparation)

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.	
Corps d'oligosaccharide lié sur le dolichol.....	15
Figure 2.	
Processus de N-glycosylation chez la cellule eucaryote	17
Figure 3.	
Types de N-glycans.....	18
Figure 4.	
Voie métabolique de synthèse du dolichol.....	23
Figure 5.	
Structures des récepteurs à sept domaines transmembranaires.....	31
Figure 6.	
Classes de récepteurs à sept domaines transmembranaires et leurs sites d'interactions avec leurs agonistes	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
AngI	angiotensine I
AngII	angiotensine II
AngIII	[desAsp ¹]angiotensine II
AngIV	[desAsp ¹ , desArg ²]angiotensine II
AngII-Bpa ¹	[Bpa ¹ , Val ⁵]AngII
AngII-Bpa ⁸	[Sar ¹ , Val ⁵ , Bpa ⁸]AngII
AngII-N ₃	[Sar ¹ , Val ⁵ , D-Phe ⁸ (N ₃)]AngII
BP	benzophénone
Bpa	p-benzoyl-phénylalanine
DAG	diacylglycérol
2,3 DéhydroDol-PP	2,3 déhydrodolichyl pyrophosphate
7DTM	sept domaines transmembranaires
EPO	érythropoïétine
FPP	farnésyl pyrophosphate
FSH	follicitropine
Glc	D-glucose
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
GMPc	guanosine 3'-5'-cyclique monophosphate
GTP	guanosine 5'-triphosphate
hCG	chorionadotropine humaine
HMG-CoA	hydroxyméthylglutaryl coenzyme A
IP3	inositol 1, 4, 5-triphosphate
kDa	kilo Dalton
LH	lutropine

Man	D-mannose
MAP	mitogen-activated protein
M _r	masse moléculaire apparente
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBP	périplasmic binding protein
P-Dol	dolichol-phosphate
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PGI ₂	prostacycline
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PNGase-F	glycopeptidase-F
PTPase	phosphotyrosine phosphatase
RE	réticulum endoplasmique
SDS	sodium dodécyl sulfate
SRA	système rénine-angiotensine
TSH	thyrotropine

INTRODUCTION

1. Le système rénine-angiotensine

L'hormone angiotensine II (AngII) a été identifiée il y a plus de 50 ans par BRAUN-MENENDEZ *et al.* (1940) et PAGE & HELMER (1940). L'attrait particulier pour ce puissant peptide vasoactif a permis, depuis cette période, l'identification du système rénine-angiotensine, l'identification des nombreux rôles physiologiques de l'hormone et plus récemment l'élucidation des séquences primaires de ses récepteurs et des mécanismes transductionnels reliés à leur activation. Aujourd'hui, de nombreux agents thérapeutiques sont utilisés en clinique pour intervenir directement dans le fonctionnement du système rénine-angiotensine et contrôler ainsi la pression sanguine. Le système rénine-angiotensine est un système hormonal et enzymatique complexe contrôlant l'homéostasie sodique et hydrique, le volume sanguin et la pression sanguine (VALLOTTON, 1987). L'AngII, un octapeptide, est le médiateur humoral actif de ce système. Les effets principaux de l'AngII sont de stimuler la synthèse et la sécrétion d'aldostérone par le cortex surrénalien et d'augmenter la pression sanguine via une contraction des muscles lisses artériolaires. L'AngII a plusieurs autres effets tels que la stimulation du système nerveux sympathique via la relâche d'épinéphrine par la médullosurrénale, une induction de la glycogénolyse au niveau du foie, une diminution de la filtration glomérulaire via la contraction des cellules mésangiales et la vasoconstriction des artérioles afférentes et efférentes, la réabsorption rénale de sodium et quelques effets centraux incluant l'induction de la sécrétion d'ACTH et de prolactine au niveau de l'hypophyse antérieure et une induction de la production de vasopressine au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Au niveau central, l'AngII induit aussi la soif et augmente l'appétit pour le sel (PEACH *et al.*, 1981; VALLOTTON, 1987;). De plus, il a été récemment démontré que l'AngII stimule la croissance de plusieurs types cellulaires dont les myocytes cardiaques, les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules adrénocorticales, les fibroblastes, les cellules mésangiales et les cellules endothéliales de la microvasculature

coronarienne (CHASSAGNE *et al.*, 1996; SCHELLING *et al.*, 1991; PRATT et DZAU, 1993).

La synthèse de l'AngII est un phénomène bien caractérisé. La cascade d'événements menant à cette synthèse est dépendant de plusieurs précurseurs et enzymes. L'angiotensinogène, une glycoprotéine de 61.4 à 65.4 kDa (TEWKSBURY, 1983), est la première composante de la cascade. La majeure partie de la synthèse de l'angiotensinogène se fait dans le foie (NASJLETTI *et al.*, 1971; RICHOUX *et al.*, 1983). De plus certaines études rapportent la synthèse de l'angiotensinogène dans le système nerveux central (cerveau de rat) (MURAKAMI *et al.*, 1984), dans l'oeil humain (SRAMEK *et al.*, 1992), dans le rein et la surrénale (UNGER *et al.*, 1991), suggérant ainsi la présence de systèmes rénine-angiotensine autocrins ou paracrins. L'angiotensinogène, libérée dans la circulation générale, subit l'action d'une protéase spécifique, la rénine, qui est synthétisée et sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires des reins (HOBART *et al.*, 1984). L'angiotensinogène est clivée à sa partie amino-terminale pour donner l'angiotensine I (AngI), un décapeptide pratiquement inactif. L'AngI est par la suite clivée à sa partie carboxyl-terminale par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), principalement au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire, pour produire l'AngII, l'octapeptide actif. Une autre enzyme moins spécifique, la chymase cardiaque, peut aussi cliver l'angiotensinogène ou l'AngI pour produire l'AngII (HUSAIN, 1993). L'AngII est par la suite métabolisée en AngIII et en AngIV par des aminopeptidases. L'AngIII est aussi active ou plus active que l'AngII dans certains systèmes. Jusqu'à maintenant, aucune action physiologique n'a été attribuée à l'AngIV. Cependant, la présence de sites de liaison spécifiques pour ce peptide dans certains tissus et certaines lignées cellulaires ainsi que l'observation de quelques effets *in vivo* et *in vitro* suggèrent que ce peptide a probablement plusieurs fonctions. Il a été démontré que l'AngIV induit la vasodilatation de la microvasculature au niveau du cortex cérébral de lapin et du cortex rénal du rat et l'inhibition de la synthèse de protéines au

niveau des myocytes cardiaques (BAKER *et al.*, 1990; HABERL *et al.*, 1991; HARDING *et al.*, 1992; SWANSON *et al.*, 1992; BERNIER *et al.*, 1994; BERNIER *et al.*, 1995).

2. Les récepteurs de l'angiotensine II

Les différents effets de l'AngII sont médiés via l'activation de récepteurs spécifiques à la surface des cellules cibles. Le développement récent d'analogues non-peptidiques tels le DuP 753 (un dérivé biphenyle tétrazole) et le PD 123319 (un dérivé tétrahydroimidazo pyridine) a permis l'identification d'au moins deux types de récepteurs de l'AngII. Des études ont en effet démontré que le DuP 753 (Losartan, Cozaar™) inhibe complètement la liaison de l'AngII dans l'aorte de rat (HERBLIN *et al.*, 1991). Par contre, le DuP 753 est incapable d'inhiber la liaison de l'AngII dans la médullosurrénale de rat et l'utérus humain (CHIU *et al.*, 1989; WHITEBREAD *et al.*, 1989). Enfin le DuP 753 n'inhibe que partiellement (à 80%) la liaison de l'AngII dans le cortex surrénalien de rat (CHIU *et al.*, 1989). D'autres études ont cependant démontré que les composés PD 123319 et PD 123177 inhibent la liaison de l'AngII résistante au DuP 753 dans le cortex et la médullosurrénale de rat (CHIU *et al.*, 1989) ainsi que dans l'utérus humain (WHITEBREAD *et al.*, 1989). Suite à ces observations, une nomenclature a été adoptée pour les récepteurs de l'AngII (DE GASPARO *et al.*, 1994). Le récepteur de type 1 (AT₁) est reconnu préférentiellement par le DuP 753 et ses dérivés tandis que le récepteur de type 2 (AT₂) est reconnu préférentiellement par le PD 123319 et ses dérivés. Ces observations pharmacologiques et biochimiques, suggérant l'existence de deux types de récepteurs de l'AngII, ont été récemment confirmées par l'isolation des ADN complémentaires codants respectivement pour les récepteurs AT₁ et AT₂. (voir les parties 2.1 et 2.2).

2.1 Le récepteur AT₁

2.1.1. Structure

Le récepteur AT₁ a été cloné à partir de plusieurs tissus dont le muscle lisse vasculaire de rat et le cortex surrénalien bovin. Ce récepteur fait partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G ayant la topologie à sept domaines transmembranaires (7DTM) (MURPHY *et al.*, 1991; SASAKI *et al.*, 1991). Suite au clonage du récepteur bovin et de rat, une seconde isoforme, désignée AT₁B, a été isolée chez le rat et la souris (YE & HEALY, 1992; SASAMURA *et al.*, 1992). Les deux isoformes du récepteur AT₁ sont très semblables, partageant 95% d'homologie au niveau de la séquence protéique. Contrairement aux rongeurs, le génôme humain contient un seul gène codant pour le récepteur AT₁ localisé sur le chromosome 3q21-3q25 (CURNOW *et al.*, 1992). Le récepteur AT₁ est constitué de 359 acides aminés avec une masse moléculaire évaluée à 41 kDa. Cependant, la masse moléculaire apparente (M_r) de ce récepteur varie grandement en fonction des tissus et espèces où il est exprimé (GUILLEMETTE *et al.*, 1983; GUILLEMETTE *et al.*, 1986; CARSON *et al.*, 1987). Ce phénomène est attribuable à différents degrés de glycosylation du récepteur (CARSON *et al.*, 1987).

2.1.2. Mécanismes de transduction et fonctions

Les mécanismes de transduction activés par le récepteur AT₁ ont été largement étudiés. Il est maintenant évident que ce récepteur est couplé à au moins deux types de protéines G, soit une protéine de type G_q et une protéine de type G_i, qui relaient le signal à différents effecteurs (CATT *et al.*, 1993). Le couplage du récepteur AT₁ à la protéine de type G_q stimule, via la sous-unité alpha de cette dernière, la phospholipase C (isoforme β) qui clive le phosphatidylinositol bisphosphate membranaire pour générer le diacylglycérol

(DAG) et l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP₃), deux seconds messagers (BERRIDGE, 1987). Le DAG active la protéine kinase C (PKC) (NISHIZUKA, 1988) tandis que l'IP₃ stimule son récepteur sur le réticulum endoplasmique et provoque la libération de calcium intracellulaire (BERRIDGE et IRVINE, 1984). Le calcium libéré active la calmoduline qui, à son tour, active une protéine kinase (la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline) (KLEE, 1988). Les actions combinées de cette kinase, de la calmoduline, de la PKC et du calcium sont responsables d'une grande partie des effets biologiques de l'AngII incluant la contraction musculaire, la production d'aldostérone et la glycogénolyse (CATT *et al.*, 1993). Le récepteur AT₁ peut aussi stimuler d'autres phospholipases telles que la phospholipase D (PLD) et la phospholipase A₂ (PLA₂) (CATT *et al.*, 1993). La phospholipase D hydrolyse le phosphatidylcholine en acide phosphatidique et choline (LASSEGUE *et al.*, 1993). Bien qu'un rôle prédominant de l'activation de la PLD par l'AngII reste à démontrer dans un contexte physiologique, il est proposé que la formation d'acide phosphatidique par la PLD sert de précurseur important au DAG dans les cellules glomérulées du rat et du boeuf (CATT *et al.*, 1993). Le phosphatidylinositol contient une grande quantité d'acide arachidonique (AA) en position 2 du glycérol. La relâche d'AA, par l'action directe de la PLA₂ sur le phosphatidylinositol ou par la DAG lipase sur le DAG libéré des phospholipides, stimule une voie de signalisation menant à la formation des éicosanoïdes. La stimulation de cette voie par l'AngII stimule la production d'acide 12-hydroxy-eicosatétraénoïque chez les cellules glomérulées et l'inhibition de cette voie interfère avec l'effet stéroïdogénique de l'AngII (NATRARAJAN *et al.*, 1988). Ces évidences suggèrent une implication de la voie de la lipoxygénase dans l'effet stéroïdogénique de l'AngII. Comme les autres hormones mobilisant le calcium, l'AngII stimule aussi l'influx de calcium à travers des canaux calciques sensibles au voltage et, possiblement, d'autres canaux de type "receptor-operated" (CATT *et al.*, 1993). Dans plusieurs tissus l'AngII inhibe la formation d'AMP cyclique (JARD *et al.*, 1981; CRANE *et al.*, 1982). L'adénylyl cyclase est couplée au récepteur AT₁ via une protéine Gi

(GRIENDLING *et al.*, 1994). En inhibant l'adénylyl cyclase, l'AngII atténue des fonctions dépendantes de l'activation de la PKA tel le transport à travers l'épithélium rénal (DOUGLAS *et al.*, 1990). Plusieurs évidences montrent que les sous unités bêta et gamma des protéines G peuvent moduler directement l'activité d'effecteurs tels certains canaux potassiques et calciques, l'adénylyl cyclase, la PLC β et la MAPK (CONKLIN & BOURNE, 1993; CLAPHAM & NEER, 1993; FAURE *et al.*, 1994; LUTTRELL *et al.*, 1995; IKEDA, 1996; HERLITZE *et al.*, 1996). Bien que l'implication directe de ces sous-unités dans la transduction signalitique médiée par le récepteur AT $_1$ n'a pas encore été démontrée, la grande diversité des effecteurs activés ou inhibés par ses sous-unités suggère que l'AT $_1$ utilise également cette voie pour propager son signal d'activation à travers la cellule.

Comme plusieurs autres peptides vasoactifs, l'AngII stimule, via le récepteur AT $_1$, la phosphorylation des résidus tyrosines de plusieurs protéines et est un puissant agent hypertrophique dans plusieurs types cellulaires tels les cellules musculaires lisses vasculaires et les myocytes cardiaques. Des études récentes suggèrent fortement que ces deux phénomènes sont intimement liés puisque l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases abolit complètement l'induction de la synthèse de protéines stimulée par l'AngII (LEDUC *et al.*, 1995). Plusieurs équipes ont rapporté que l'AngII stimule puissamment l'activité enzymatique des MAP (mitogen-activated protein) kinases dans les cellules musculaires lisses vasculaires et autres cellules cibles (TSUDA *et al.*, 1991; GLASSON *et al.*, 1995). L'inhibition des MAP kinases abolit la synthèse de protéines induite par l'AngII (SERVANT *et al.*, 1996). Les résultats d'une étude récente (SADOSHIMA et IZUMO, 1996) permettent de suggérer un modèle faisant le lien entre la phosphorylation en tyrosine et l'activation des MAP kinases induite par l'AngII. Comme le récepteur AT $_1$ ne possède aucune activité tyrosine kinase, il recrute et active, par des mécanismes encore inconnus, une tyrosine kinase de la famille des Src (la Fyn kinase). Cette dernière phosphoryle

l'adaptateur Shc qui recrute à son tour Grb2 et Sos pour enfin activer l'échange de nucléotide sur la petite protéine G p21ras. Il s'ensuit alors une cascade de phosphorylations multiples menant à l'activation de la MAP kinase (SADOSHIMA et IZUMO, 1996). D'autres tyrosine kinases sont aussi activées par l'AngII telles la focal adhesion kinase p125^{FAK} et une nouvelle tyrosine kinase cytosolique dépendante du calcium (EARP *et al.*, 1995). Parallèlement à ces études, il a été démontré que l'AngII peut aussi, via le récepteur AT₁, augmenter la phosphorylation de tyrosines du facteur de transcription STAT1 (BHAT *et al.*, 1994; MARRERO *et al.*, 1995). De plus il est suggéré que cette phosphorylation se fait via l'activation des tyrosine kinases Jak 2 ou Tyk 2 qui interagiraient directement avec le récepteur AT₁ (MARRERO *et al.*, 1995). L'ensemble de ces résultats démontre que le récepteur AT₁ emprunte aussi des voies de signalisation non classiques pour des récepteurs couplés aux protéines G et assignées initialement exclusivement aux récepteurs à activité tyrosine kinase et aux récepteurs des cytokines.

2.2 Le récepteur AT₂

2.2.1. Distribution et caractérisation primaire des mécanismes de transduction

Au cours des sept dernières années, la présence du récepteur AT₂ a été démontrée dans de nombreux tissus provenant de différentes espèces animales. Des études de liaison et d'autoradiographie ont permis de détecter ce récepteur dans la médullosurrénale (CHIU *et al.*, 1989; DE GASPARO *et al.*, 1990), le cerveau (CHANG *et al.*, 1990; LEUNG *et al.*, 1991), les ovaires (PUCELL *et al.*, 1991) le coeur et l'aorte de rat (VISWANATHAN *et al.*, 1991) ainsi que dans les tissus mésenchymateux du rat fœtal (GRADY *et al.*, 1991). Le récepteur AT₂ est aussi présent dans l'utérus de lapin et l'utérus humain (WHITEBREAD *et al.*, 1989; DUDLEY *et al.*, 1990) et dans le cortex surrénalien bovin (BOULAY *et al.*, 1992). Ce récepteur est également retrouvé sur certains types cellulaires incluant une lignée

de phéochromocytomes de rat (PC-12), une lignée de fibroblastes de souris Swiss-3T3 (SPETH *et al.*, 1990; DUDLEY *et al.*, 1991) et quelques lignées neuronales de rat (TALLANT *et al.*, 1991; SUMNERS *et al.*, 1991).

Un effort considérable a été fourni au cours des dernières années pour caractériser et identifier les mécanismes d'action du récepteur AT₂. Même aujourd'hui, un bon nombre d'observations contradictoires laissent plusieurs questions sans réponse définitive. Cependant, dès le début de ces études, il a rapidement été démontré que le récepteur AT₂ n'utilise pas les mêmes voies de transduction signalitiques que le récepteur AT₁. En effet, chez les cellules PC-12, Swiss 3T3 et une lignée primaire de cellules granulosa ovariennes de rat, la stimulation du récepteur AT₂ ne provoque pas de mobilisation de calcium intracellulaire et n'influence pas l'activité de l'adénylyl cyclase (DUDLEY *et al.*, 1991; PUCCELL *et al.*, 1991; LEUNG *et al.*, 1992; WEBB *et al.*, 1992). Ce récepteur n'active pas la PLA₂ ou la PLD, ne semble pas induire la synthèse de protéines ou d'ADN et ne stimule pas l'activité de tyrosine kinases intracellulaires (DUDLEY *et al.*, 1991; LEUNG *et al.*, 1992; WEBB *et al.*, 1992). D'autre part, l'insensibilité du récepteur AT₂ à l'effet d'analogues non-hydrolysables du GTP, lors d'essais de liaison avec des membranes de cellules PC-12 et d'utérus humain, a mené à la suggestion que ce récepteur n'est pas couplé aux protéines G (DUDLEY *et al.*, 1991; BOTTARI *et al.*, 1991; WEBB *et al.*, 1992). Cependant, des études subséquentes effectuées avec d'autres tissus ont démontré un couplage qui serait possiblement dépendant du type cellulaire ou de l'existence de plusieurs sous-types de récepteurs. En effet, le récepteur AT₂ de certaines régions du cerveau de rat (la région thalamique ventrale, le noyau médian géniculé et le locus coeruleus) est sensible à la présence d'analogues non-hydrolysables du GTP tandis que le récepteur AT₂ de l'olive inférieure est insensible à la présence de ces composés (TSUTSUMI et SAAVEDRA, 1992). Suite à l'identification du récepteur AT₂, plusieurs suggestions ont été faites relativement aux effets cellulaires découlant de l'activation du récepteur AT₂. Ainsi

SUMNERS *et al.* (1991) et BOTTARI *et al.* (1992) ont observé une baisse du niveau basal de GMPc dans les cellules PC-12 et les neurones de rat suite à une stimulation de récepteur AT₂. Par contre, deux études indépendantes des groupes de LEUNG *et al.* (1992) et WEBB *et al.* (1992) n'ont pu reproduire ces résultats dans le même type cellulaire. Il a aussi été proposé que le récepteur AT₂ des cellules PC-12, d'une lignée de neuroblastomes de souris et des cellules Swiss-3T3 active une phosphotyrosine phosphatase (PTPase) (BOTTARI *et al.*, 1992; NAHMIAS *et al.*, 1995; BUISSON *et al.*, 1995; YAMADA *et al.*, 1996). Cependant WEBB *et al.* (1992) et LEUNG *et al.* (1992) n'ont pu observer ce phénomène chez les cellules PC-12. De plus, KAMBAYASHI *et al.* (1993) ont observé une diminution de l'activité PTPase suite à l'activation du récepteur AT₂. A la lumière de ces observations il est évident que le récepteur AT₂ emprunte des voies de signalisation non classiques, complexes et probablement fortement influençables par les conditions expérimentales utilisées pour les étudier.

2.2.2. Structure

Le récent clonage et l'élucidation de la structure primaire du récepteur AT₂, à partir de tissus de rats fœtaux et des cellules PC-12 (KAMBAYASHI *et al.*, 1993; MUKOYAMA *et al.*, 1993), a fourni de nouveaux indices sur la nature particulière de ce récepteur. Bien que les études biochimiques précédentes n'avaient pas permis de déterminer si ce récepteur est couplé à une protéine G, sa séquence primaire démontre qu'il possède plusieurs caractéristiques des récepteurs de cette grande famille: la séquence de 363 acides aminés possède sept domaines hydrophobes suggérant une topologie semblable à celle des récepteurs à sept domaines transmembranaires (7DTM), cinq sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) en amino-terminal, la séquence Asp¹⁴¹-Arg¹⁴²-Tyr¹⁴³ à la fin du DTM III présente dans la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, une troisième boucle intracellulaire courte ainsi qu'une longue région hydrophile en carboxyl-

terminal contenant un site potentiel de phosphorylation par la PKC sur la Ser³⁵⁴. Le récepteur AT₂ ne possède que 32% d'homologie de séquence en acides aminés avec le récepteur AT₁ et est donc un nouveau membre de la superfamille des récepteurs à 7DTM. Contrairement au récepteur AT₁, aucun autre sous-type de récepteur AT₂ n'a été identifié jusqu'à maintenant. Le récepteur AT₂ humain a aussi été cloné (TSUZUKI *et al.*, 1994). Il possède 93% d'homologie de séquence en acides aminés avec le récepteur de rat et son gène a été localisé sur le chromosome sexuel X à la position q22-q23 (CHASSAGNE *et al.*, 1995).

2.2.3. Aspects moléculaires et données biochimiques suggérant le couplage

Fait intéressant, deux autres récepteurs, le récepteur D₃ de la dopamine et le récepteur SSTR1 de la somatostatine partagent quelques-unes des propriétés moléculaires et biochimiques du récepteur AT₂. La troisième boucle intracellulaire de ces trois récepteurs contient un résidu leucine et quatre résidus chargés qui leur sont exclusifs (MUKOYAMA *et al.*, 1993). Des études démontrent que les récepteurs D₃ et SSTR1 sont insensibles aux analogues non-hydrolysables du GTP mais qu'ils sont néanmoins couplés à des protéines de types Gi (SOKOLOFF *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1994; HADCOCK *et al.*, 1994; SEABROOK *et al.*, 1994). Une étude récente (ZHANG *et al.*, 1996) montre l'interaction directe entre le récepteur AT₂ et les sous-unités α_{i2} et α_{i3} des protéines G. De plus, d'autres études fonctionnelles suggèrent un couplage entre le récepteur AT₂ et une protéine G sensible à la toxine de pertussis (KAMBAYASHI *et al.*, 1993; KANG *et al.*, 1994; YAMADA *et al.*, 1996). Basé sur ces données, nous pouvons suggérer que les récepteurs AT₂, D₃ et SSTR1 font partie d'une classe de récepteurs atypiques, couplés aux protéines G, pour laquelle l'affinité n'est pas ou peu influencée par le GTP. Cette insensibilité au GTP pourrait être causée par un couplage non conventionnel. Il est aussi possible que seulement une très faible proportion de ces récepteurs soient effectivement

couplés aux protéines G et que ce faible taux de couplage ne soit pas détectable lors d'essais classiques de liaison.

2.2.4. Fonctions

Quelques observations récentes suggèrent que le récepteur AT₂ pourrait avoir plusieurs fonctions biologiques. Ainsi une augmentation du courant potassique sortant a été observée chez les neurones de l'hypothalamus, du bulbe rachidien et de la medulla oblongata de rat suite à une stimulation du récepteur AT₂ (KANG *et al.*, 1992; KANG *et al.*, 1994). Parallèlement à ces études, il a été observé que le récepteur AT₂ des cellules NG108-15 (une lignée dérivée d'un hybridome de neuroblastomes et de gliomes) inhibe un canal calcique de type T (BUISSON *et al.*, 1992; BUISSON *et al.*, 1995). L'ensemble de ces observations suggère que le récepteur AT₂ pourrait moduler la conduction neuronale et ainsi orchestrer certaines fonctions du système nerveux central. Cette hypothèse est supportée par des travaux récents montrant que chez la souris transgénique déficiente en récepteur AT₂, il y a une baisse de l'activité locomotrice, une diminution de la température corporelle ainsi qu'une altération du comportement exploratoire (HEIN *et al.*, 1995; ICHIKI *et al.*, 1995).

Bien que les premiers travaux, effectués chez les lignées de phéochromocytomes et de fibroblastes de souris, aient suggéré que le récepteur AT₂ ne stimule pas la PLA₂ (DUDLEY *et al.*, 1991; WEBB *et al.*, 1992), de nombreuses études effectuées dans d'autres types cellulaires suggèrent que l'activation de ce récepteur peut induire la production d'AA et de prostacyclines. Chez les astrocytes humains le récepteur AT₂ est couplé à la production de PGI₂ par un mécanisme indépendant de la mobilisation de calcium intracellulaire (JAISWAL *et al.*, 1991). Chez une culture primaire de myocytes de rat le récepteur AT₂ stimule la formation d'AA et de prostacycline. Cet effet n'est pas

couplé à la mobilisation de calcium intracellulaire puisque l'utilisation d'un bloqueur de la PLC n'abolit pas la réponse médiée par l'AT₂ (LOKUTA *et al.*, 1994). Chez une lignée cellulaire de pré-adipocytes, les Ob 1771, la stimulation du récepteur AT₂ induit la production de PGI₂. Cette production de prostacycline est inhibée par l'aspirine démontrant que l'activité de la cyclooxygénase est stimulée par l'entremise du récepteur AT₂, fort probablement via la production d'AA. De plus, cette libération de prostacycline stimule la différenciation des cellules en adipocytes matures suggérant ainsi un rôle pour le récepteur AT₂ dans ces mécanismes (DARIMONT *et al.*, 1994). Finalement, chez les ovaires perfusés de lapin, l'AngII augmente la production de PGE₂ via la stimulation du récepteur AT₂. Ce récepteur active aussi la production d'estradiol et induit la maturation des ovules et l'ovulation (YOSHIMURA *et al.*, 1996). Il est connu qu'un système rénine-angiotensine tissulaire existe au niveau des ovaires et que les gonadotropines stimulent ce système (OHKUBO *et al.*, 1986; KIM *et al.*, 1987; YOSHIMURA *et al.*, 1992; YOSHIMURA *et al.*, 1994). Il est donc suggéré que la maturation des ovules et que l'ovulation sont médiés en partie par la relâche d'AngII. Cette hormone active le récepteur AT₂ des cellules granulosas ovariennes qui, par des mécanismes encore inconnus, stimule la relâche de prostacyclines et de stéroïdes impliqués dans ces phénomènes.

Chez le rat fœtal, le récepteur AT₂ est exprimé abondamment au niveau des tissus mésenchymateux. Après parturition, l'expression du récepteur AT₂ diminue grandement. Il n'est exprimé que dans quelques régions précises du cerveau, dans le coeur, les surrénales et les organes reproducteurs femelles (GRADY *et al.*, 1991). Par contre, l'expression du récepteur AT₂ augmente significativement lors du processus de cicatrisation cutanée et après désendothélialisation de la paroi vasculaire. Elle augmente aussi dans le coeur, au cours de l'hypertrophie ventriculaire gauche induite par une sténose de l'aorte thoracique (VISWANATHAN & SAAVEDRA, 1992; LOPEZ *et al.*, 1994). Ces observations suggèrent que le récepteur AT₂ pourrait être impliqué dans les mécanismes de croissance

et/ou de différenciation cellulaire. Il a été récemment démontré qu'au niveau des cellules endothéliales des artères coronaires de rat, le récepteur AT₂ médie l'inhibition de la prolifération cellulaire stimulée par le sérum (STOLL *et al.*, 1995). Dans le modèle de resténose post-angioplastique, l'injection d'un transgène codant pour le récepteur AT₂ diminue la formation néointimale (NAKAJIMA *et al.*, 1995). Il a aussi été récemment proposé que le récepteur AT₂ induit le processus apoptotique des cellules PC-12 et Swiss 3T3 privées de sérum (YAMADA *et al.*, 1996). Cet effet serait médié en partie par l'induction de l'expression de la MAPK phosphatase-1. Il a été observé également que l'expression du récepteur AT₂ augmente lors de l'apoptose des cellules granulosa ovariennes de rat (TANAKA *et al.*, 1995). Ces études suggèrent que le récepteur AT₂ sert de frein aux mécanismes de prolifération cellulaire et ce, en partie, via l'induction des mécanismes apoptotiques. Cependant, l'intégration de ces données obtenues *in vitro*, dans un contexte physiologique d'homéostasie tissulaire reste encore à démontrer. En effet l'inactivation du récepteur AT₂ chez les souris transgéniques n'induit aucun dysfonctionnement ni aucune modification tissulaire au cours du développement embryonnaire où il y a une croissance rapide d'une multitude de types cellulaires (HEIN *et al.*, 1995; ICHIKI *et al.*, 1995).

3. Les glycoprotéines

Une grande majorité des protéines synthétisées par les cellules eucaryotes sont N-glycosylées. Ces protéines contiennent en effet des chaînes d'oligosaccharides plus ou moins volumineuses liées de façon covalente à la chaîne latérale de l'acide aminé asparagine. Les mécanismes biochimiques responsables de cette modification co et post-traductionnelle sont grandement conservés à travers les cellules eucaryotes et de nombreuses molécules intervenant directement dans ce processus peuvent être utilisées *in vivo* afin de déterminer les rôles de la N-glycosylation des protéines. La prochaine section

de cette introduction traite du processus de N-glycosylation des protéines, des différents modes d'interventions biochimiques utilisés afin de déterminer ses rôles et finalement des différents concepts développés sur les rôles de la N-glycosylation des récepteurs.

3.1. Processus de N-glycosylation

Le processus de N-glycosylation commence par la synthèse d'un intermédiaire lipidique le Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol (figure 1). Cet oligosaccharide est assemblé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) sur un lipide très volumineux, le dolichol phosphate (P-Dol). Les monosaccharides sont d'abord transférés à ce site, un à un, sur la face cytoplasmique du RE en commençant par deux molécules de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et cinq résidus D-mannose (Man), chacun d'eux étant dérivés d'un analogue nucléotidique (KORNFELD & KORNFELD, 1985). Par la suite, l'intermédiaire Man₅GlcNAc₂-PP-Dol ainsi formé transloque du côté de la lumière du RE et l'élongation se poursuit avec l'ajout de quatre résidus Man et trois résidus D-glucose (Glc), dérivés d'intermédiaires lipidiques Dol-P-Glc et Dol-P-Man retrouvés sur la membrane interne du RE. L'ajout de ces monosaccharides au niveau du PP-Dol se fait via l'action de plusieurs glycosyltransférases spécifiques retrouvées à la fois du côté cytoplasmique et de la lumière du RE. L'oligosaccharide Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol, correspond au corps principal de N-glycosylation servant à la formation de tous les types de N-glycan retrouvés chez les cellules eucaryotes.

Lors de la traduction, ce corps principal de N-glycosylation est transféré, à l'aide d'une oligosaccharyltransférase, sur le résidu asparagine d'un motif Asn-X-Ser/Thr (figure 2) (KORNFELD & KORNFELD, 1985). Le processus de glycosylation se poursuit alors sur la protéine pendant la traduction par l'hydrolyse du premier résidu Glc avec une alpha1,2 glucosidase I et l'hydrolyse subséquente des deux autres résidus Glc par la

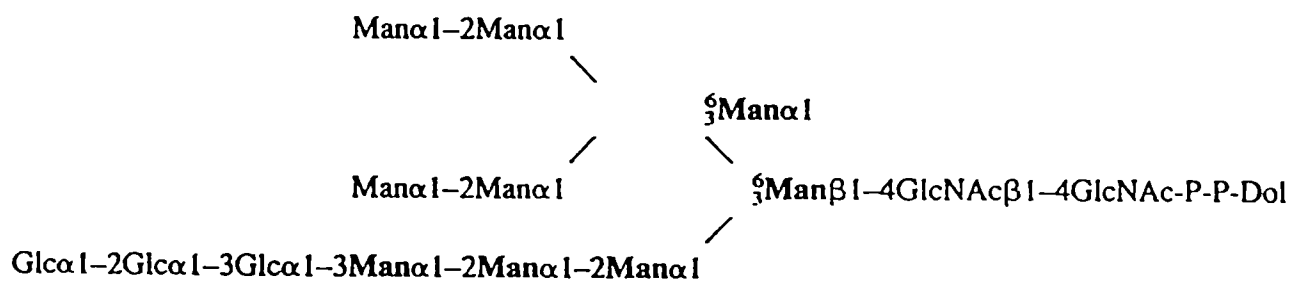


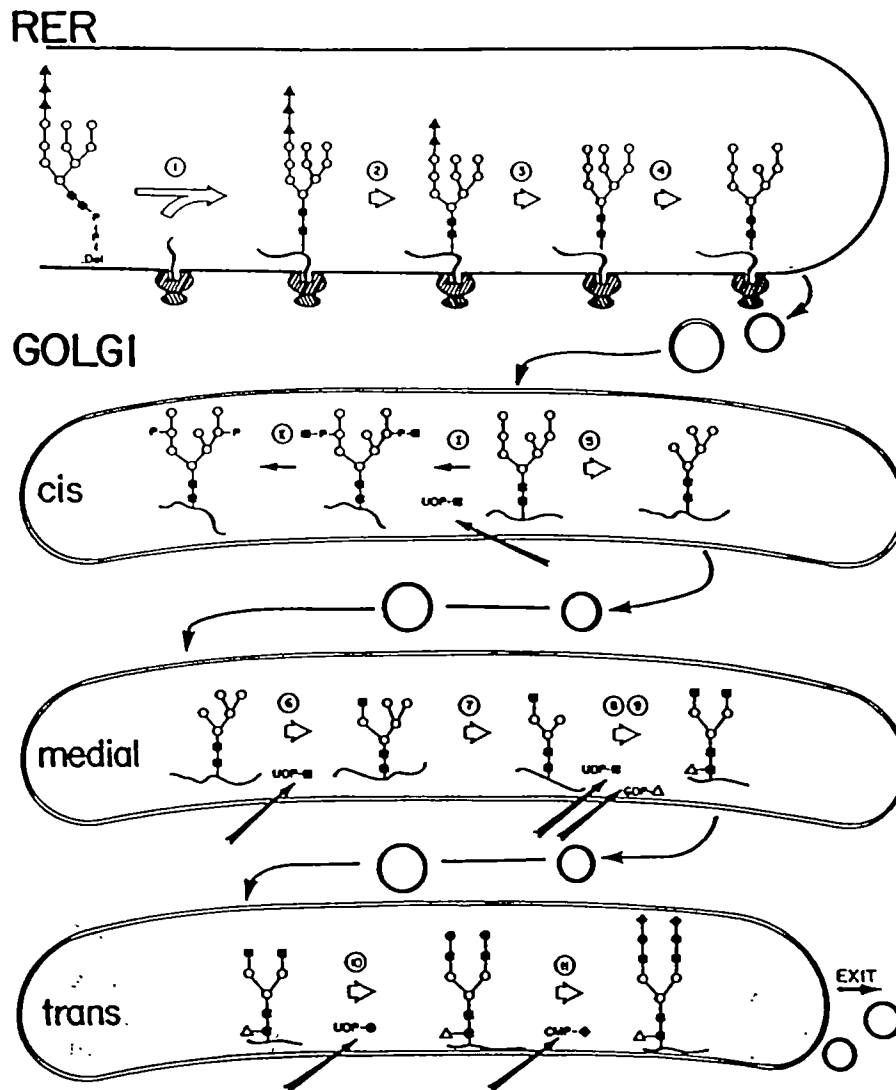
Figure 1. Corps d'oligosaccharide lié sur le dolichol

La synthèse de ce précurseur se fait sur la face cytoplasmique et dans la lumière du RE

figure tirée de KORNFIELD & KORNFIELD, 1985

alpha1,3 glucosidase II. De même, l'hydrolyse d'un résidu Man s'effectue, suite à celle des trois résidus Glc, par une alpha-mannosidase spécifique. À cette étape, les glycoprotéines sont alors transportées au cis-Golgi via des vésicules qui originent du RE et fusionnent avec la membrane de ce dernier (figure 2). La vitesse avec laquelle les glycoprotéines sortent du RE varie grandement et ce en fonction de leur nature et des tissus où elles sont exprimées (GABEL & KORNFELD, 1984; LODISH *et al.*, 1983) et il semble que l'épissage des résidus Glc et Man du corps principal constitue, dans certains cas, une étape limitante pour le transport vers l'appareil de Golgi (LODISH & KONG, 1984; LEMANSKY *et al.*, 1984). C'est dans l'appareil de Golgi que le processus de N-glycosylation se complète pour produire les différents types de N-glycans. Au niveau du cis-Golgi, certains résidus Man du corps de glycosylation peuvent être phosphorylés par l'action de deux enzymes: la N-acétylglucosaminylphosphotransférase et la N-acétylglucosamine-1-phosphodiesterase alpha-N-acétylglucosaminidase. Cette phosphorylation se retrouve sur les glycoprotéines lysosomales et elle est responsable du ciblage de ces dernières vers les lysosomes. D'autre part, le corps principal de glycosylation peut aussi subir l'action d'une alpha1,2 mannosidase du cis-Golgi produisant ainsi les glycoprotéines riches en Man (figures 2 et 3). Selon les cas, le processus de glycosylation peut se poursuivre pour produire soit les types complexes ou hybrides de chaînes d'oligosaccharides (figures 2 et 3). Dans ce cas, les protéines, arrivées au niveau du médial-Golgi et trans-Golgi par transport vésiculaire, subissent l'action de différentes glycosyltransférases qui ajoutent successivement des molécules de GlcNAc, galactose, fucose et acide sialique au corps de glycosylation riche en Man (figures 2 et 3).

Le nombre et la nature des chaînes d'oligosaccharides sur une même protéine peuvent varier significativement et les récepteurs à 7DTM illustrent très bien cette réalité. Que ce soit pour le récepteur β_2 adrénergique, D2 dopaminergique, A1 purinergique, et AT1 de l'AngII, l'observation de populations réceptorielles de tailles moléculaires



Schematic pathway of oligosaccharide processing on newly synthesized glycoproteins. The reactions are catalyzed by the following enzymes: (1) oligosaccharyltransferase, (2) α -glucosidase I, (3) α -glucosidase II, (4) ER α 1,2-mannosidase, (5) N -acetylglucosaminylphosphotransferase, (6) N -acetylglucosaminylphosphodiester α - N -acetylglucosaminidase, (7) Golgi α -mannosidase I, (8) N -acetylglucosaminyltransferase I, (9) Golgi α -mannosidase II, (10) N -acetylglucosaminyltransferase II, (11) fucosyltransferase, (12) galactosyltransferase, (13) sialyltransferase. The symbols represent: ■, N -acetylglucosamine; ○, mannose; ▲, glucose; ▽, fucose; ●, galactose; ◆, sialic acid.

Figure 2. Processus de N-glycosylation chez la cellule eucaryote

figure tirée de KORNFIELD & KORNFIELD, 1985

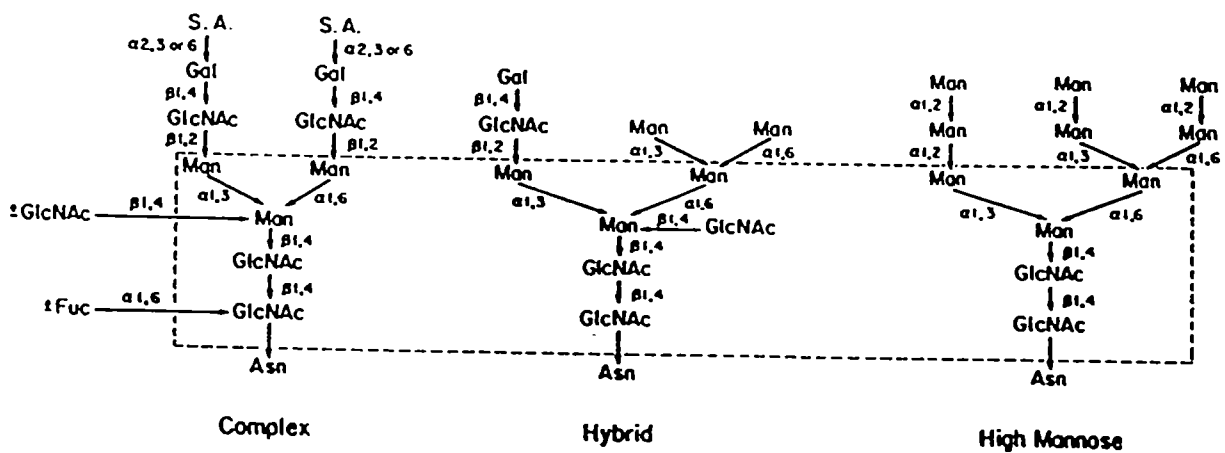


Figure 3. Types de N-glycans

Les chaînes sont liées sur l'acide aminé asparagine (Asn) d'un site potentiel de N-glycosylation.

figure tirée de KORNFIELD & KORNFIELD, 1985

variables, en fonction des tissus ou espèces, est attribuable à la présence de différentes chaînes d'oligosaccharide sur ces protéines (STILES *et al.*, 1984; STILES, 1984; KLOTZ & LOHSE, 1986; CARSON *et al.*, 1987; CERVANTES-OLIVIER *et al.*, 1988; JARVIE *et al.*, 1988; CLAGETT-DAME & MCKELVY, 1989). De plus, il a été démontré que la variabilité des degrés de N-glycosylation peut être aussi attribuable aux différents degrés d'occupation des sites potentiels de glycosylation par les chaînes d'oligosaccharide (GOOCHEE *et al.*, 1992). Ces différents degrés d'occupation ou la présence de différentes chaînes d'oligosaccharide au sein d'une même population de glycoprotéines synthétisées par le même type cellulaire est appelé phénomène de microhétérogénéité de la glycosylation. Ce phénomène, observé chez plusieurs glycoprotéines, dont les récepteurs, semble être en grande partie responsable de l'apparition de glycoprotéines, de masses moléculaires apparentes variables, chez une même cellule (STILES *et al.*, 1984; GOOCHEE *et al.*, 1992). Les facteurs contrôlant le degré de N-glycosylation et les types de N-glycan ajoutés, (qu'ils soient de type riche en Man, hybride ou complexe) (figure 3) sont nombreux et encore mal compris. Néanmoins il est aujourd'hui évident que le processus de N-glycosylation est grandement influencé par le type cellulaire, par la conformation de la protéine destinée au processus de glycosylation et par l'environnement cellulaire.

Des différences significatives de patron de glycosylation peuvent être observés pour une protéine à travers les espèces et à travers les types cellulaires d'une même espèce (PAREKH *et al.*, 1987; PAULSON, 1989). L'influence du type cellulaire sur le processus de N-glycosylation apparaît lié surtout à la présence des différentes glycosidases et glycosyltransférases. L'environnement cellulaire et l'état de croissance des cellules peuvent également affecter significativement le processus de N-glycosylation (PAREKH, 1991b; GOOCHEE *et al.*, 1992). Ainsi, il a été démontré que chez une lignée de carcinome humain, le récepteur β_2 -adrénergique présent sur les cellules préconfluentes est exprimé sous aux moins deux glycoformes distinctes, soit une forme riche en Man et une autre

forme de type complexe. Par contre les mêmes cellules n'expriment que la forme riche en Man lorsqu'elles sont postconfluentes (CERVANTES-OLIVIER *et al.*, 1988). Parmi les mécanismes potentiels pouvant expliquer cette dépendance on retrouve: 1) l'influence directe de l'environnement cellulaire sur l'état énergétique cellulaire, 2) l'altération de l'environnement local du RE et de l'appareil de Golgi, 3) l'interférence avec le transport vésiculaire, 4) la modulation de l'activité des différentes glycosidases et glycosyltransférases et 5) le contrôle de la transcription des gènes codant pour ces enzymes ainsi que la stabilité de leurs ARNm respectifs. D'autre part, les protéines exercent elles-mêmes une influence considérable sur leur propre N-glycosylation (KORNFELD & KORNFELD, 1985; YET *et al.*, 1988; GOOCHEE *et al.*, 1992). La structure locale d'une protéine peut masquer l'accessibilité des monosaccharyles et de leurs glycosyltransférases à un site potentiel de glycosylation. À cet effet, CARVER & CUMMING (1987) ont proposé que les glycosyltransférases ont possiblement des K_m différents selon les sites potentiels de N-glycosylation. De la même façon, il est légitime de penser que les glycosidases impliquées dans le processus peuvent voir leur site d'hydrolyse masqué par une partie de la protéine. La glycosylation à un site peut influencer la glycosylation à un autre site soit par encombrement stérique ou par modification de la structure tertiaire de la protéine. Finalement il a également été démontré que pour les protéines multimériques, l'interaction des différentes sous-unités dans le RE peut avoir des répercussions directes sur le processus d'élongation des chaînes d'oligosaccharides se faisant dans l'appareil de Golgi.

3.2. Inhibiteurs du processus de N-glycosylation

Plusieurs types d'inhibiteurs intervenant directement dans le processus de N-glycosylation peuvent être utilisés afin de déterminer les rôles potentiels de cette modification. Ces inhibiteurs sont répertoriés en trois grandes classes incluant les

inhibiteurs de la voie de glycosylation lipidique, les inhibiteurs d'élongation des chaînes d'oligosaccharide et les inhibiteurs de la synthèse du dolichol. La nature, les modes d'utilisation et les effets des différents composés de ces classes d'inhibiteurs ont été discutés d'une façon détaillée dans deux excellentes revues (SCHWARZ & DATEMA, 1982; ELBEIN, 1984).

L'inhibiteur de choix au niveau de la voie de glycosylation lipidique est sans aucun doute la tunicamycine. Cet antibiotique dérivé d'un mycélium, *Streptomyces lysosuperificus*, a été utilisé par un très grand nombre de fundamentalistes afin d'identifier les rôles de la N-glycosylation des protéines. Sa popularité est reliée au fait qu'il permet l'inhibition complète du mécanisme de N-glycosylation. Ce composé inhibe la GlcNAc-1-P transférase, l'enzyme qui transfère le premier NAcGlc, à partir du UDP-GlcNAc, sur le P-Dol pour former le GlcNAc-PP-Dol. Le GlcNAc-PP-Dol sert d'accepteur pour les autres molécules de sucres afin de former l'intermédiaire lipidique complet Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol, qui est transféré par la suite sur la protéine (figures 1 et 2). Puisque l'intermédiaire lipidique Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol est le donneur ultime de la chaîne d'oligosaccharide sur la protéine (figure 2), l'inhibition de sa synthèse, par la tunicamycine, abolit complètement le processus de N-glycosylation. Cependant cette très grande efficacité à inhiber la N-glycosylation de façon non-sélective peut altérer la croissance de certains types cellulaires ainsi que le processus de synthèse de protéines (MAHONEY & DUKSIN, 1979; ATIENZA-SAMOLS *et al.*, 1980; DUKSIN & MAHONEY, 1982; DUKSIN *et al.*, 1982; ELBEIN, 1984). Il devient donc impératif de vérifier ces paramètres avant de tirer des conclusions sur les effets d'une inhibition de la N-glycosylation par la tunicamycine. D'autres antibiotiques, ayant des structures analogues à celle de la tunicamycine, ont été isolés et semblent avoir le même site d'action que la tunicamycin. Ces composés incluent la streptovirudine, la mycospocidine, l'antibiotique 24010 et l'antibiotique MM 19290

(MIZANO *et al.*, 1971; ECKARDT *et al.*, 1975; TKACZ & WONG, 1978; KENIG & READING, 1979).

Parmi les inhibiteurs d'élongation des chaînes d'oligosaccharide les plus efficaces et populaires il y a la swainsonine, la castanospermine et la deoxynojirimycine. La swainsonine est un alkaloïde dérivé de la plante *Swainsona canescens*. Cet alkaloïde inhibe l'alpha manosidase II du cis-Golgi (figure 2) et prévient donc l'hydrolyse des liens alpha1,3- et alpha1,6-Man du précurseur. De cette façon, la voie d'élongation vers les N-glycans de type complexe est bloquée mais en revanche les chaînes hybrides ou riches en Man peuvent toujours être formées (figure 2). En utilisant ce composé, il est donc possible de vérifier l'influence des chaînes de type complexe sur les fonctions et les différentes destinées d'une protéine. La castanospermine est un autre alkaloïde végétal dérivé de *Castanospermum australe* tandis que la deoxynojirimycine est un antibiotique produit par plusieurs souches de bacilles. La castanospermine et la deoxynojirimycine inhibent respectivement les glucosidases I et II du RE. En présence de ces composés l'élongation des chaînes d'oligosaccharide vers les voies complexes ou hybrides ne peut se faire et seules les chaînes riches en Man sont formées (figure 2).

Les taux de P-Dol sont apparemment limitants au niveau des membranes et une variation de ces taux peut avoir des conséquences directes sur le processus de N-glycosylation. La synthèse du P-Dol procède essentiellement par les mêmes réactions initiales de synthèse du cholestérol (figure 4). Ces réactions permettent la conversion de l'acétate en hydroxyméthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) et de l'acide mévalonique en farnésyl pyrophosphate (FPP). A partir de ce point le FPP peut soit être transformé en dérivés squalène et cholestérol ou en 2,3-déhydrodolichyl pyrophosphate (2,3 DehydroDol-PP) pour produire subséquemment le P-Dol (figure 4). La synthèse du cholestérol et du P-Dol est contrôlée essentiellement par l'activité de l'HMG-CoA

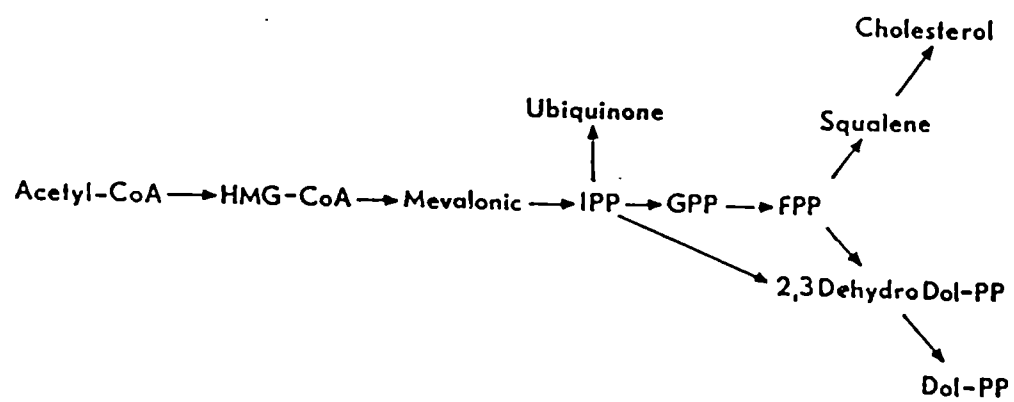


Figure 4. Voie métabolique de synthèse du dolichol

figure tirée de ELBEIN, 1984

réductase, l'enzyme impliquée dans la conversion du HMG-CoA en mévalonate (figure 4). Plusieurs inhibiteurs de cet enzyme, comme la compactine qui inhibent la synthèse du cholestérol, bloquent également la formation du P-Dol et par voie de conséquence la N-glycosylation des protéines (ELBEIN, 1984).

3.3. Rôles de la N-glycosylation

La présence de chaînes d'oligosaccharides N-liées peut avoir des effets marqués sur la structure (repliement, conformation) de la glycoprotéine. Ces effets ont parfois un impact direct sur les propriétés physicochimiques, la maturation et l'activité de la glycoprotéine

3.3.1. Effets sur quelques paramètres physicochimiques

Généralement la N-glycosylation augmente la solubilité et diminue l'aggrégation des glycoprotéines *in vitro*. Les chaînes d'oligosaccharides contribuent ainsi à augmenter, via leurs groupements polaires, la nature hydrophilique de la glycoprotéine. Une démonstration directe de cet effet est que l'enlèvement des chaînes d'oligosaccharides augmente généralement le temps de rétention d'une glycoprotéine en chromatographie en phase inversée (UTSUMI *et al.*, 1987; PAREKH *et al.*, 1989). La présence de chaînes d'oligosaccharides N-liées augmente généralement la résistance aux attaques protéolitiques. Ainsi, plusieurs glycoprotéines tels les immunoglobulines, la ribonucléase pancréatique de porc et la fibronectine, sont plus sensibles aux attaques protéolitiques *in vitro* lorsqu'elles sont déglycosylées (WANG & HIRS, 1977; OLDEN *et al.*, 1979; SIBLEY & WAGNER, 1981). De plus, l'absence d'oligosaccharides N-liés augmente la dégradation intracellulaire de plusieurs glycoprotéines dont le précurseur de l'endorphine et de l'immunoglobuline A (LOH & GAINER, 1979; TAYLOR & WALL, 1988). Il est proposé que cet effet protecteur est dû à l'encombrement de certains sites de clivage à la surface des protéines

(MONTREUIL, 1984; YET & WOLD, 1990). Dans certains cas, l'enlèvement partiel ou complet des chaînes d'oligosaccharides N-liées augmente la susceptibilité de la glycoprotéine à la dénaturation thermique. Par exemple, l'enlèvement des résidus d'acide sialique des chaînes N-liées de l'érythropoïétine (EPO) augmente significativement la dénaturation de cette dernière lorsque soumise à une température de 70 °C (GOLDWASSER *et al.*, 1974; TSUDA *et al.*, 1990). Dans ce cas, il est possible que les chaînes d'oligosaccharides augmentent la stabilité thermique via des interactions directes avec certaines portions protéiques de la glycoprotéine (GOOCHEE *et al.*, 1992).

3.3.2. Effets sur la maturation et l'activité des glycoprotéines

Parallèlement aux considérations d'ordre plus général ci-haut mentionnées, plusieurs études ont démontré que la N-glycosylation peut être impliquée directement dans les mécanismes de maturation, d'acquisition de conformations actives, de transport, de ciblage et de sécrétion d'une multitude de glycoprotéines (GOOCHEE *et al.*, 1992; FIEDLER & SIMONS, 1995).

La plupart des récepteurs présents à la surface des cellules sont des glycoprotéines possédant une ou plusieurs chaînes d'oligosaccharides N-liées. Les propriétés de liaison et d'activation des récepteurs sont intimement reliés à leurs structures et conformations. Pour certains de ces récepteurs, la N-glycosylation joue un rôle important dans l'acquisition et/ou le maintien de leur conformation active. De très bons exemples de ces rôles de la N-glycosylation sont ceux des récepteurs de l'épidermal growth factor (EGF), de l'interféron gamma, de la fibronectine et de la transférine où une perte significative d'affinité est mesurée lorsque la N-glycosylation est bloquée métaboliquement (MANGELSDORF SODERQUIST & CARPENTER, 1984; SLIEKER & LANE, 1985; SLIEKER *et al.*, 1986; GAMOU & SHIMIZU, 1988; AKIYAMA *et al.*, 1989; HUNT *et al.*, 1989; FISHER

et al., 1990; WILLIAMS & ENNS, 1991). Il est ainsi conclu que les chaînes d'oligosaccharides N-liées contribuent à l'acquisition des conformations permissives à la liaison (conformations dites actives). Plus précisément, l'acquisition de la conformation active du récepteur à l'EGF, se fait entre autre, par la transformation de ces chaînes riches en Man en chaînes de type complexe (SLIEKER & LANE, 1985). Dans le cas du récepteur de l'insuline, l'isomérisation du précurseur inactif en précurseur actif est également dépendant de la présence des chaînes d'oligosaccharides (OLSON *et al.*, 1988). Des conclusions similaires ont également été tirées pour quelques membres de la famille des récepteurs à 7DTM. Ainsi, l'élimination de deux sites potentiels de N-glycosylation (par mutagenèse dirigée) au niveau de la longue extension amino-terminale du récepteur de la follitropine (FSH) abolit complètement la liaison du ^{125}I -FSH (DAVIS *et al.*, 1995). La déglycosylation enzymatique de ce récepteur n'affecte pas ses propriétés de liaison et donc il est conclu que les chaînes d'oligosaccharides ne sont pas directement impliquées dans la liaison mais qu'elles ont un effet direct sur l'adoption de la conformation active du récepteur. Par contre, pour un autre membre de la famille des récepteurs aux glycoprotéines, le récepteur de l'hormone lutéinisante (LH), certaines chaînes N-liées dans l'extension amino-terminale, en plus de participer à l'adoption de la conformation active du récepteur, semblent également être impliquées directement dans la liaison et/ou le maintien de la conformation active du récepteur (MINEGISHI *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 1991). Les résidus terminaux d'acide sialique sur les chaînes hybrides ou complexes du récepteur de la somatostatine contribuent significativement à la liaison de la somatostatine (RENSDOMIANO & REISINE, 1991). Les auteurs suggèrent que les résidus d'acide sialique de ce récepteur participent directement à la liaison avec l'hormone. La N-glycosylation semble aussi affecter modestement la conformation active des récepteurs β -adrénergique, du vasoactive intestinal peptide (VIP) et D₂-dopaminergique où des pertes d'affinité de facteurs ~trois ont été observées suite à la déglycosylation, l'inhibition métabolique de la N-glycosylation ou l'élimination de sites potentiels de N-glycosylation (GRIGORIADIS *et*

al., 1988; RANDS *et al.*, 1990; EL BATTARI *et al.*, 1991). La N-glycosylation semble aussi être impliquée au niveau des mécanismes moléculaires d'activation du récepteur β_2 -adrénergique et du récepteur de l'EGF (MANGELSDORF SODERQUIST & CARPENTER, 1984; CERVANTES-OLIVIER *et al.*, 1988; BOEGE *et al.*, 1988). Dans le cas du récepteur rhodopsine, l'inhibition de la N-glycosylation, soit à l'aide de la tunicamycine ou par mutagenèse dirigée, altère la capacité du récepteur à activer la transducine (KAUSHAL *et al.*, 1994). Dans ces cas précis, il est également conclu que la N-glycosylation affecte les conformations d'activation de ces récepteurs.

Les effets les plus remarquables de l'inhibition de la N-glycosylation des récepteurs sont ceux observés au niveau de leur processus de maturation, de ciblage et de transport. Par exemple, les récepteurs de l'EGF et de l'insuline sont incapables de maturer complètement en absence de N-glycosylation et restent emprisonnés dans la cellule, au niveau du RE (RONNETT & LANE, 1981; RONNETT *et al.*, 1984; MANGELSDORF SODERQUIST & CARPENTER, 1984; SLIEKER *et al.*, 1986; ARAKAKI *et al.*, 1987; OLSON *et al.*, 1988; COLLIER *et al.*, 1993). D'autre part, des études plus poussées ont démontré que le réarrangement des ponts disulfure et l'assemblage des sous-unités du récepteur à l'insuline sont dépendants de la N-glycosylation de son précurseur (RONNETT *et al.*, 1984; OLSON *et al.*, 1988). Fait intéressant, les récepteurs de l'EGF et de l'insuline sont transportés vers la membrane plasmique lorsque l'hydrolyse des résidus Glc du corps principal de glycosylation est bloquée soit par la castanospermine ou la 1-déoxyjirimicine (figure 2), mais leurs temps de translocation est fortement augmenté (SLIEKER *et al.*, 1986; ARAKAKI *et al.*, 1987). Toutes ces données expérimentales suggèrent que l'ajout du corps principal de N-glycosylation est nécessaire à la maturation et au transport de ces protéines vers leur destination et que l'élongation de leurs chaînes d'oligosaccharides a des effets plus subtils reliés, par exemple, aux cinétiques de transport. De la même façon, les récepteurs CD4 et à la transférine restent emprisonnés dans le RE lorsque certains sites de

N-glycosylation sont mutés tout comme le transporteur de la norépinéphrine qui, en absence de N-glycosylation, est moins exprimé à la surface des cellules (WILLIAMS & ENNS, 1991; TIFFT *et al.*, 1992; HOE & HUNT, 1992; MELIKIAN *et al.*, 1996). Les mécanismes de rétention des protéines non-glycosylées dans le RE ou dans d'autres organelles sont assez mal compris. Quelques observations suggèrent néanmoins que certaines protéines chaperonnes, résidentes du RE, pourraient reconnaître les protéines immatures et interagir avec ces dernières afin de les retenir et les soumettre à la dégradation protéolytique (WILLIAMS & ENNS, 1991; HOE & HUNT, 1992; FIEDLER & SIMONS, 1995).

La N-glycosylation a également un effet évident sur le processus de maturation et de transport de certains membres de la famille des récepteurs à 7DTM. Ainsi le transport du récepteur β_2 -adrénergique est altéré lorsque la N-glycosylation est inhibée par la tunicamycine ou que les sites potentiels de N-glycosylation du récepteur sont abolis par mutagénèse (CERVANTES-OLIVIER *et al.*, 1988; RANDS *et al.*, 1990). L'inhibition partielle ou totale de la N-glycosylation du récepteur du VIP affecte aussi son transport vers la membrane plasmique (EL BATTARI *et al.*, 1991). Le récepteur du facteur d'aggrégation des plaquettes (PAF) est également très sensible à la présence d'oligosaccharides N-liés puisque son expression, à la surface des cellules, est diminuée de 70% suite à la mutation de son seul site potentiel de N-glycosylation situé sur la deuxième boucle extracellulaire (GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.*, 1995). Finalement, le récepteur de la lutropine/choriogonadotropine (LH/hCG) reste emprisonné à l'intérieur de la cellule lorsqu'un de ses sites potentiels de N-glycosylation situé sur la longue extension aminoterminal est aboli (LIU *et al.*, 1993). Les mécanismes de rétention de ces protéines n'ont pas été étudiés mais il est fort probable que ces récepteurs, incorrectement repliés dû au manque de glycosylation, soient retenus dans le RE tout comme les récepteurs de l'insuline et de la transférine.

Malgré ces nombreux exemples d'effets de la N-glycosylation sur la maturation et la fonction des récepteurs, on ne peut prédire l'impact d'une telle modification sur une glycoprotéine en particulier. En cela, les fonctions et/ou processus de maturation de nombreux récepteurs incluant les récepteurs A₁ et A₂ de l'adénosine, D₂ de la dopamine, m₂ de l'acétylcholine, AT₁ de l'AngII et V₂ de la vasopressine ne semblent pas être affectés par des traitements inhibants leur N-glycosylation (KLOTZ & LOHSE, 1986; CLAGETT-DAME & MCKELVY, 1989; VAN KOPPEN & NATHANSON, 1990; YAMANO *et al.*, 1992; PIERSEN *et al.*, 1994; INNAMORATI *et al.*, 1996). Il devient donc important de vérifier l'impact de cette modification pour chaque nouvelle glycoprotéine étudiée.

4. Les domaines de liaison des récepteurs à 7DTM

Avec l'identification, au cours des dernières années, d'une multitude de séquences primaires de récepteurs à 7 DTM, plusieurs fundamentalistes se sont penchés sur l'identification de domaines et même d'acides aminés directement impliqués dans l'interaction avec les ligands. Ces nombreuses recherches ont permis de définir assez précisément les modes d'interaction de certains ligands avec leurs récepteurs et, dans certains cas, elles ont permis l'élaboration de stratégies pour le développement d'agents plus sélectifs et plus puissants pour bloquer la stimulation réceptorielle (CASCIERI *et al.*, 1995).

Il est aujourd'hui accepté que les récepteurs à 7DTM adoptent fort probablement *in vivo* une structure similaire à celles proposées pour la bactériorhodopsine et le récepteur β_2 -adrénergique (DONNELLY *et al.*, 1989; HENDERSON *et al.*, 1990; BALDWIN, 1993). Ces modèles structuraux proposent que les sept régions hydrophobes, qui sont en fait des hélices alpha, résident dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et qu'elles sont

reliées entre elles par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires (figure 5a). Ces modèles suggèrent également que les parties amino- et carboxyl-terminales de ces récepteurs se prolongent respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule (figure 5a). Il est aussi suggéré que ces hélices alpha se positionnent d'une façon circulaire dans la membrane plasmique, et ce, dans le sens contraire aux aiguilles d'une montre à partir de l'hélice rattachée à l'extension amino-terminale extracellulaire (figure 5b).

4.1. Les domaines de liaison des agonistes

Différents mécanismes sont utilisés par les récepteurs à 7DTM pour reconnaître leur ligands. Ces mécanismes sont résumés schématiquement à la figure 6. À partir des structures de leurs ligands respectifs, on peut définir au moins six classes de récepteurs à 7DTM. La rhodopsin (figure 6a), sûrement un des récepteurs à 7DTM les mieux caractérisés, est particulier puisque son ligand naturel, le chromophore rétinale, y est attaché de façon covalente par une base de Schiff, au niveau du septième domaine transmembranaire sur la lysine 296. D'autres études ont de plus montré que ce chromophore se retrouve à mi-chemin, entre les domaines transmembranaires, à environ 22 Å dans la bicouche lipidique (THOMAS & STRYER, 1982; KHORANA, 1992).

Les récepteurs des bioamines tels les cathécolamines, la sérotonine, l'histamine et l'acétylcholine utilisent un mécanisme similaire pour reconnaître leurs ligands. Les domaines de liaison de ces petites molécules (~200 Da) sont situés exclusivement entre les domaines transmembranaires, dans le premier tiers extérieur de la bicouche lipidique (STRADER *et al.*, 1994) (figure 6a). Les résidus de ces récepteurs, impliqués directement dans la liaison, ont été situés dans le deuxième, troisième, quatrième, cinquième et sixième domaines transmembranaires (STRADER *et al.*, 1994). Pour le récepteur β -adrénergique,

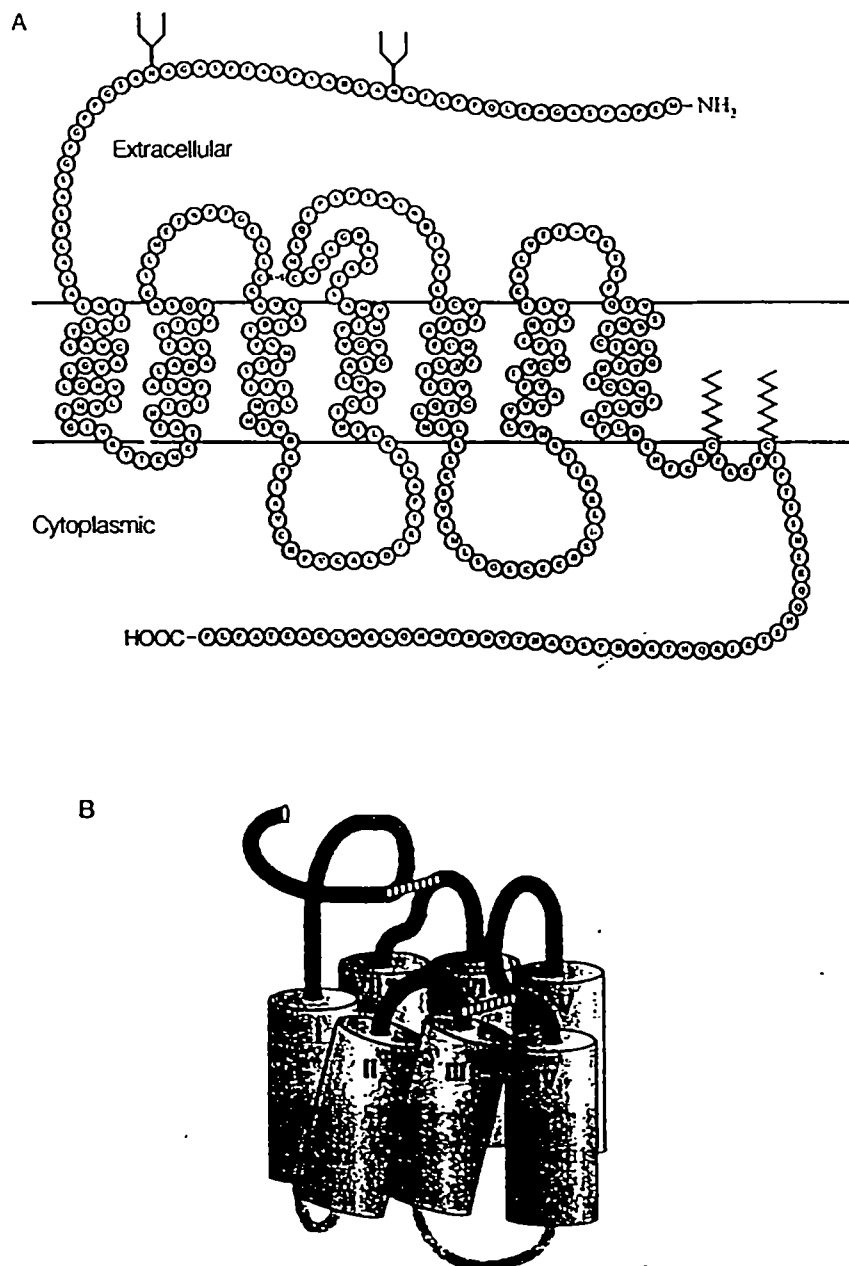


Figure 5. Structures des récepteurs à sept domaines transmembranaires

En A, représentation en deux dimensions du récepteur delta des opiacés. Sont illustrés également les sites potentiels de N-glycosylation de l'extension amino-terminale ainsi que les sites potentiels de palmitoylation sur deux résidus cystéine de l'extension carboxyl-terminale (BOUVIER *et al.*, 1995). En B, représentation en trois dimensions du récepteur AT₁ de l'AngII. Les ponts disulfures entre l'extension amino-terminale et la troisième boucle extracellulaire ainsi qu'entre la première et seconde boucle extracellulaire sont représentées par les barres hachurées.

figures tirées de HJORTH et al., 1994 et VALIQUETTE et al., 1996

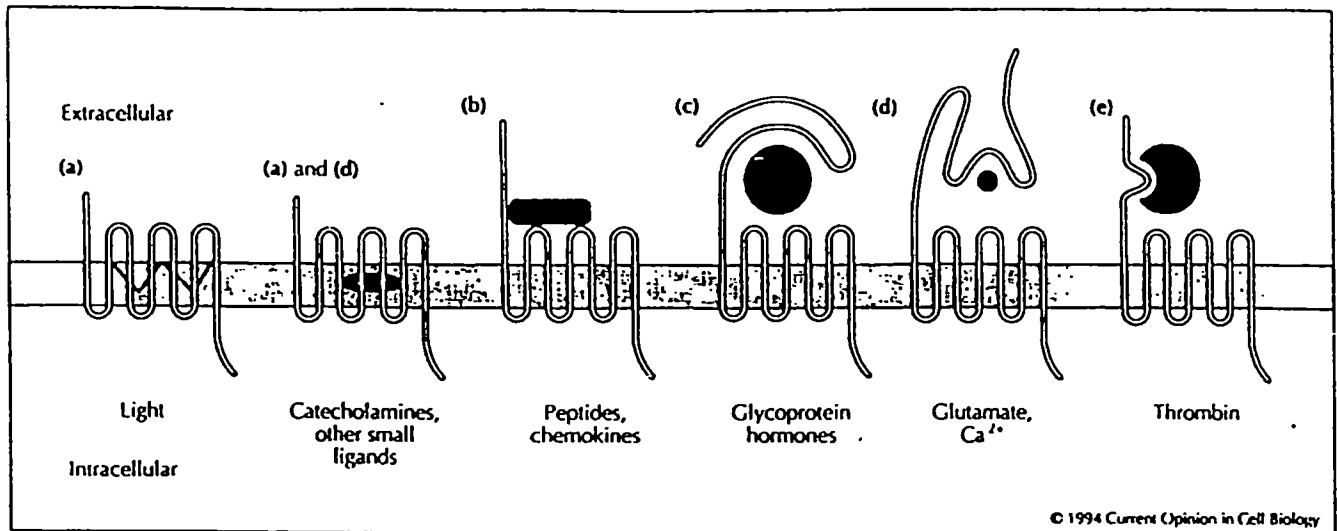


Figure 6. Classes de récepteurs à sept domaines transmembranaires et leurs sites d'interactions avec leurs agonistes

figure tirée de COUGHLIN, 1994

l'aspartate 113, situé dans le troisième domaine transmembranaire, sert de contre-ion à la fonction positive amine de l'adrénaline et fournit ainsi la majeure partie de l'énergie de liaison (STRADER *et al.*, 1987). Les groupements hydroxyls de l'anneau cathécol sont stabilisés via des interactions hydrogènes avec des résidus sérines situés dans le cinquième domaine transmembranaire et un résidu phénylalanine du sixième domaine transmembranaire stabilise le groupement phényl de l'anneau cathécol (OSTROWSKI *et al.*, 1992; STRADER *et al.*, 1994). Contrairement aux bioamines, les agonistes purinergiques, qui sont également des ligands de petites tailles, interagissent à la fois avec les domaines transmembranaires et extracellulaires de leurs récepteurs. Ainsi, des résidus importants à la liaison ont été localisés au niveau de la deuxième boucle extracellulaire et au niveau du troisième, cinquième et septième domaines transmembranaires. Il est proposé que les résidus hydrophiles thréonine et sérine, des troisième et septième domaines transmembranaires, servent de sites d'interaction avec la partie ribose des agonistes purinergiques (KIM *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 1996). Ces résultats montrent clairement que la taille d'un ligand ne peut à elle seule expliquer son mode d'interaction avec son récepteur.

Des ligands beaucoup plus volumineux que les bioamines tels la FSH, la LH et la thyrotropine (TSH) interagissent également avec les récepteurs à 7DTM. De par leur taille importante (>10 kDa) on peut croire que les sites d'interactions de ces molécules avec leurs récepteurs diffèrent de ceux déterminés pour les bioamines. Comme illustré en figure 6c, la majeure partie de l'énergie de liaison de ces molécules sont localisé dans la longue extension amino-terminale (qui peut avoir jusqu'à environ 340 acides aminés) de leurs récepteurs respectifs (BOCKAERT, 1991; MOYLE *et al.*, 1991; NAGAYAMA *et al.*, 1991; COUGHLIN, 1994). Cependant le récepteur de la LH, auquel l'extension amino-terminale a été tronquée, reconnaît toujours son ligand mais avec une très faible affinité. De plus, ce récepteur mutant conserve sa capacité d'activation par la hCG seulement à des

concentrations élevées (JI & JI, 1991). Par ces résultats, un modèle d'interaction a été proposé suggérant que la longue extension amino-terminale stabilise le ligand et l'oriente vers une poche d'activation composée de résidus situés proche de la membrane plasmique (JI & JI, 1991; COUGHLIN, 1994). Une mutation naturelle située au niveau du septième domaine transmembranaire du récepteur de la LH provoque une perte d'affinité pour la LH et est responsable d'une forme d'hypogonadisme (LATRONICO *et al.*, 1996). Cette observation appuie fortement l'hypothèse que des résidus transmembranaires des récepteurs aux hormones glycoprotéiques participent également à l'interaction avec les ligands.

Comme en témoigne la figure 6b, les premières études ont démontré que des ligands de tailles intermédiaires tels l'AngII, la vasopressine, la substance-P, le neuropeptide-Y et le chemoattractant fMet-Leu-Phe interagissent avec les domaines extracellulaires de leurs récepteurs respectifs (FONG *et al.*, 1992; KOJRO *et al.*, 1993; WALKER *et al.*, 1994; HJORTH *et al.*, 1994; COUGHLIN, 1994). Suite à ces travaux, il est cependant devenu évident, comme dans le cas des récepteurs aux hormones glycoprotéiques, que les récepteurs de ces ligands utilisent également des déterminants protéiques intramembranaires lors de l'interaction. Dans le cas du récepteur AT₁ de l'AngII, les nombreuses données expérimentales obtenues suite aux études de mutagenèses dirigées suggèrent que les parties amino- et carboxyl-terminales de la molécule se retrouvent respectivement entre les boucles extracellulaires et les hélices alpha du récepteur lors de l'interaction (HUNYADY *et al.*, 1996). Selon ce modèle d'interaction deux acides aminés chargés de la deuxième et troisième boucles extracellulaires, l'histidine 183 et l'aspartate 281, servent respectivement de contre-ions aux résidus amino-terminaux aspartate1 et arginine 2 de la molécule d'AngII (FENG *et al.*, 1995). En revanche, il est proposé que le résidu histidine 6 de la molécule d'AngII est stabilisé par une interaction ionique et hydrophobe avec des résidus aspartate et phénylalanine situés dans le sixième domaine transmembranaire (YAMANO *et al.*, 1995).

La partie carboxyl du résidu phénylalanine 8 de la molécule semble être stabilisé par un pont ionique avec le groupement latéral amine du résidu lysine 199 situé dans le cinquième domaine transmembranaire tandis que la partie phényl de cet acide aminé semble participer dans une interaction hydrophobe avec un résidu tryptophane du sixième domaine transmembranaire (NODA *et al.*, 1995; YAMANO *et al.*, 1995; HUNYADY *et al.*, 1996). Toutes ces données suggèrent que la molécule d'AngII, entre au moins jusqu'au tiers de la bicouche lipidique entre les domaines transmembranaires lors de l'interaction avec le récepteur AT₁ (YAMANO *et al.*, 1995). Le domaine de liaison des agonistes du récepteur NK-1 des neurokinines a aussi été grandement investigué. Les premières études de mutagenèse dirigées ont suggéré que d'importants déterminants structuraux pour la liaison se situaient dans les régions extracellulaires de ce récepteur, notamment au niveau de l'extension amino-terminale, de la première et de la seconde boucles extracellulaires (FONG *et al.*, 1992a; FONG *et al.*, 1992b; HUANG *et al.*, 1994a). Les études subséquentes de cartographies, à l'aide d'agonistes photoactivables, ont reconfirmé ces résultats tout en délimitant des points de contact entre la partie amino-terminale de la substance-P (SP) et les résidus 1-21 de l'extension amino-terminale du récepteur NK-1 et entre le résidu phénylalanine 8 de la molécule et les résidus 178-183 de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur (LI *et al.*, 1995; BOYD *et al.*, 1996). Ce point de contact a ensuite été identifié comme étant la méthionine 181 de la deuxième boucle extracellulaire (KAGE *et al.*, 1996). D'autres études suggèrent également que la SP intragit avec les régions transmembranaires du récepteur NK-1 au niveau des hélices deux et sept (HUANG *et al.*, 1994b). Les auteurs proposent ainsi que la partie carboxyl-terminale de la molécule (le onzième résidu) interagit avec le résidu asparagine 85 située dans le deuxième domaine transmembranaire du récepteur NK-1 dans le premier tiers de la bicouche lipidique (HUANG *et al.*, 1994b). À partir de ces données, un modèle d'interaction est proposé où, lors de la liaison avec le récepteur NK-1, les ~ deux-tiers de la SP, du côté amino-terminal, sont stabilisés via une interaction avec les domaines extracellulaires tandis que la partie

carboxyl-terminale pénètre entre les hélices deux et sept dans la membrane plasmique (HUANG *et al.*, 1994b; LI *et al.*, 1995). Ce schéma d'interaction, impliquant à la fois des domaines extracellulaires et transmembranaires, se retrouve chez plusieurs autres types de récepteurs à 7DTM pour les ligands de tailles intermédiaires incluant le récepteur V_{1a} de la vasopressine (CHINI *et al.*, 1995; HOWL & WHEATLEY, 1996), les récepteurs de la somatostatine (KAUPMANN *et al.*, 1995; LIAPAKIS *et al.*, 1996), les récepteurs des opiacés (METZGER & FERGUSON, 1995; BEFORT *et al.*, 1996) et le récepteur du chémoattractant fMet-Leu-Phe (QUEHENBERGER *et al.*, 1993).

Le récepteur du glutamate (TANADE *et al.*, 1992) et le récepteur sensible au calcium (BROWN *et al.*, 1993; CONKLIN & BOURNE, 1994) (figure 6d) utilisent, pour détecter ces petites molécules, un mécanisme qui est totalement différent de celui emprunté par les récepteurs des bioamines. Le domaine de liaison de ces récepteur est situé dans leur long segment amino-terminal et leurs boucles extracellulaires (COUGHLIN, 1994; STERN-BACH *et al.*, 1994). Ces régions contiennent des séquences similaires à celles retrouvées chez des protéines de la paroi bactérienne, les periplasmic binding proteins (PBP), qui servent à transporter les acides aminés et autres petites molécules à l'intérieur de la bactérie (O'HARA *et al.*, 1993; OH *et al.*, 1993). Lors de la liaison, ces PBP subissent d'énormes changements conformationnels et interagissent alors avec d'autres complexes protéiques qui transportent les ligands à travers la membrane bactérienne. Par analogie avec ces observations, il est suggéré que suite à la liaison, les segments extracellulaires de ces récepteurs changent de conformation, interagissent avec d'autres régions, probablement proches des domaines transmembranaires, et activent ainsi le récepteur (COUGHLIN, 1994). Les récepteurs de la thrombine et "proteinase-activated receptor 2" ou PAR2 sont deux types de récepteurs de la grande famille des récepteurs à 7 DTM (figure 6e). Le clivage de leur extension amino-terminale extracellulaire libère une nouvelle région qui devient elle-même un ligand en interagissant avec d'autres parties du récepteur

(COUGHLIN, 1994). Les domaines d'interaction de ces "ligands-fixés" sont encore peu définis. Néanmoins il semble que leur reconnaissance soit en partie médiée par le reste de l'extension amino-terminale ainsi que les boucles extracellulaires de leurs récepteurs (GERSZTEN *et al.*, 1994; LERNER *et al.*, 1996).

4.2. Les domaines de liaison des antagonistes

Les domaines de liaison des antagonistes sont moins bien définis que ceux des agonistes et ce pour plusieurs classes de récepteurs à 7 DTM. Il est donc pour le moment, moins important de répertorier les connaissances à ce sujet en fonction des classes de récepteurs comme nous l'avons fait dans le cas des agonistes (section 4.1). Nous nous efforcerons plutôt dans cette section de relater les cas les mieux caractérisés jusqu'à maintenant.

D'une façon générale, les antagonistes adrénergiques sont chimiquement reliés aux agonistes naturels et exhibent un mécanisme d'action compétitif en recouvrant partiellement les sites d'interaction des agonistes (KOBILKA, 1992). Pour le récepteur β -adrénégique, les nombreuses études effectuées lors de l'élaboration des fameux β -bloquants, couramment utilisés aujourd'hui dans la médecine cardiovasculaire, ont montré que l'activité antagoniste corrélait très bien avec une augmentation de la portion aromatique des composés et l'éloignement du groupement amine du noyau aromatique (STRADER *et al.*, 1994). La notion de recouvrement partiel entre les sites d'interaction des agonistes et antagonistes adrénergiques est bien établie dans le cas des β -bloquants. En effet, il a été démontré que leur fonction amine interagit avec le résidu aspartate 113 du troisième domaine transmembranaire, tout comme la fonction amine des agonistes (KOBILKA, 1992; STRADER *et al.*, 1994). Il est toutefois clair que même si ces molécules partagent quelques domaines d'interaction avec leur récepteurs, certains déterminants structuraux des

récepteurs, nécessaires à la liaison, peuvent être distincts pour ces classes de molécules (STRADER *et al.*, 1987; STRADER *et al.*, 1989; WESS). De la même façon, il est suggéré que certains antagonistes purinergiques partagent quelques domaines de liaison des agonistes, notamment au niveau du cinquième domaine transmembranaire (KENNEDY *et al.*, 1996), sans toutefois s'emboîter exactement dans la même poche de liaison que les agonistes (JIANG *et al.*, 1996). Cette théorie de recouvrement partiel des sites de liaison des agonistes et antagonistes précise les notions classiques d'antagonisme compétitif.

Les mécanismes d'action moléculaires des antagonistes peptidiques compétitifs n'ont pas été vérifiés de façon systématique. La tendance actuelle étant plutôt dirigée vers la caractérisation des mécanismes d'action des nouveaux antagonistes non-peptidiques (voir le prochain paragraphe). Toutefois, les antagonistes peptidiques étant aussi reliés chimiquement à leurs agonistes respectifs, on croit que le mécanisme d'action prépondérant serait le recouvrement partiel des sites d'interactions des agonistes, tout comme dans le cas des antagonistes adrénergiques. Ainsi, dans le cas du récepteur AT₁, des mutations effectuées sur l'extension amino-terminale, la première et la troisième boucles extracellulaires diminuent la liaison de l'AngII ainsi que celle de l'antagoniste peptidique [Sar¹, Leu⁸]AngII (HJORTH *et al.*, 1994). Également, une mutation effectuée sur le résidu lysine 102 du troisième domaine transmembranaire du récepteur AT₁ diminue la liaison de l'AngII et celle de l'antagoniste [Sar¹, Ile⁸]AngII (GROBLEWSKI *et al.*, 1995). Cependant, comme dans le cas des récepteurs adrénergiques, les déterminants structuraux nécessaires à la liaison de l'AngII et de ses antagonistes ne sont pas totalement identiques. Ainsi la mutation de l'asparagine 295 du septième domaine transmembranaire du récepteur AT₁ diminue la liaison de l'AngII sans toutefois affecter celle de l'antagoniste [Sar¹, Ile⁸]AngII (HUNYADY *et al.*, 1996).

Depuis les sept dernières années, de nombreux antagonistes non-peptidiques ont été développés contre plusieurs types de récepteurs incluant ceux des tachykinines, de l'AngII, de la cholecystokinine, de la neurotensine, de la vasopressine et de l'oxytocine (GETHER *et al.*, 1995). Une grande partie de l'effort de recherche a été dirigée sur l'identification des domaines de liaison et les modes d'action de ces molécules. Les cas les mieux caractérisés sont encore ceux du récepteur AT₁ de l'AngII et du récepteur NK-1 des neurokinines. Les études de mutagénèses dirigées ont montré que les sites d'interactions de ces antagonistes sont confinés entre les domaines transmembranaires de leurs récepteurs avec essentiellement aucune contribution des domaines extracellulaires (GETHER *et al.*, 1993; FONG *et al.*, 1993; JI *et al.*, 1994; SCHAMBYE *et al.*, 1994). Des résidus potentiellement impliqués dans des interactions directes avec les antagonistes non-peptidiques ont été identifiés au niveau des deuxième et septième domaines transmembranaires du récepteur AT₁ et au niveau des cinquième et sixième domaines transmembranaires du récepteur NK-1. La plupart de ces résidus ne semblent pas impliqués dans une interaction directe avec les agonistes proposant ainsi que les domaines de liaison de ces molécules sont distincts de celles des agonistes. Pour ce qui est des antagonistes compétitifs, il est proposé que ces domaines se chevauchent à quelques endroits, faisant intervenir une fois de plus la notion d'antagonisme compétitif par recouvrement partiel des domaines de liaison (GETHER *et al.*, 1995; CASCIERI *et al.*, 1995; HUNYADY *et al.*, 1996). Le fait que certaines mutations dans le septième domaine transmembranaire du récepteur AT₁ affectent à la fois la liaison des agonistes et des antagonistes non-peptidiques supportent très bien ce concept (HUNYADY *et al.*, 1996).

La connaissance des domaines d'interaction des agonistes avec leur récepteur et des modes d'action des antagonistes est importante pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Des efforts considérables ont déjà été fournis en cette matière. Cependant les modes d'action de d'autres molécules comme les agonistes inverses (CHIDIAC *et al.*,

1994) ne sont pas encore élucidés du point-de-vue moléculaire. La compréhension de ces mécanismes d'action permettra vraisemblablement d'élaborer de nouvelles molécules importantes permettant ainsi le traitement de maladies causées par un fonctionnement constitutif de certains récepteurs.

5. Justification de l'étude

Bien que plusieurs études indiquaient la présence du récepteur AT₂ dans de nombreux tissus ou lignées cellulaires à l'époque où ces recherches ont été entreprises, ce récepteur n'était toutefois pratiquement pas caractérisé du point de vue biochimique et moléculaire. Nous nous sommes donc proposés de caractériser quelques propriétés biochimiques du récepteur AT₂ à l'aide de la technique de marquage par photoaffinité. Le principe de cette technique consiste à incorporer spécifiquement un radioligand photosensible de façon covalente à un récepteur. Les complexes ligand-récepteur ainsi formés peuvent être analysés par différentes méthodes biochimiques et soumis à différents traitements enzymatiques ou chimiques, permettant d'identifier les composantes structurales de la protéine. Au début des années 1980, la technique du marquage par photoaffinité a été utilisée par quelques groupes dont le nôtre, afin de caractériser biochimiquement le récepteur de AT₁ de l'AngII (CAPPONI & CATT, 1980; GUILLEMETTE & ESCHER, 1983; GUILLEMETTE *et al.*, 1986; CARSON *et al.*, 1987). Lors de ces études, des analogues photosensibles de l'AngII modifiés avec un groupement azido ont permis d'obtenir un rendement élevé d'incorporation covalente (40%) et d'isoler le récepteur de l'AngII qui, à cette époque, était le seul site de liaison connu pour l'octapeptide.

Dans le premier manuscrit de cette thèse, nous décrivons la caractérisation pharmacologique du récepteur AT₂ du myomètre humain et l'utilisation de différents analogues photosensibles de l'AngII dans des études de marquage par photoaffinité. A

l'aide d'un nouvel analogue photosensible de l'AngII contenant un groupement p-benzoylphénylalanine (Bpa), nous y décrivons le marquage spécifique du récepteur AT₂ et la détermination de sa masse moléculaire apparente (M_r). Dans le deuxième manuscrit, nous décrivons la détermination des M_r du récepteur AT₂ de différentes lignées cellulaires par la technique du marquage par photoaffinité et la caractérisation de la nature glycoprotéique de ce récepteur. Dans le troisième manuscrit, nous décrivons l'utilisation d'un bloqueur métabolique de la N-glycosylation sur des cellules et l'analyse des rôles de cette modification post-traductionnelle sur le ciblage et les propriétés de liaison du récepteur AT₂. Finalement dans le quatrième manuscrit, nous décrivons la localisation des domaines de liaison du récepteur AT₂ à l'aide de deux analogues photosensibles de l'AngII modifiés à chacune des extrémités de la molécule.

RÉSULTATS

Article 1

Photoaffinity labeling of subtype 2 angiotensin receptor of human myometrium

Guy Servant, Guylain Boulay, Roger Bossé, Emanuel Escher & Gaétan Guillemete

Mol. Pharmacol. 43: 677-683 (1993)

Article 2

The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation

Guy Servant, David T. Dudley, Emanuel Escher & Gaétan Guillemette

Mol. Pharmacol. **45**: 1112-1118 (1994)

Article 3

*Analysis of the role of N-glycosylation in cell-surface expression and binding properties of
angiotensin II type 2 receptor of rat pheochromocytoma cells*

Guy Servant, David T. Dudley, Emanuel Escher & Gaétan Guillemette

Biochem J. 313: 297-304 (1996)

Article 4

*Identification of angiotensin II binding domains in the rat AT₂ receptor with photolabile
angiotensin analogs*

Guy Servant, Stéphane A. Laporte, Richard Leduc, Emanuel Escher & Gaétan Guillemette
article soumis à J. Biol. Chem. (août 1996)

**IDENTIFICATION OF ANGIOTENSIN II BINDING DOMAINS IN THE
RAT AT₂ RECEPTOR WITH PHOTOLABILE ANGIOTENSIN ANALOGS**

Guy Servant, Stéphane A. Laporte, Richard Leduc, Emanuel Escher and Gaétan Guillemette

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Running Title: Peptide-Binding Domains of the AT₂ Receptor

Corresponding author:

Gaétan Guillemette, Ph.D.
Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine
Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Québec
Canada
J1H 5N4

SUMMARY

To identify binding domains between angiotensin II (AngII) and its type 2 receptor (AT₂), two different radiolabeled photoreactive analogs were prepared by replacing either the first or the last amino acid in the peptide with *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa). Digestion of photolabeled receptors with kallikrein revealed that the two photoreactive analogs label the amino-terminal part of the receptor within the first 182 amino acids. Digestion of ¹²⁵I-[Bpa¹]AngII-AT₂ receptor complex with endoproteinase Lys-C produced a glycoprotein of 80 kDa. Deglycosylation of this 80 kDa product decreased its apparent molecular mass (M_r) to 4.6 kDa and further cleavage of this 4.6 kDa product with V8 protease decreased its M_r to 3.6 kDa, circumscribing the labeling site of ¹²⁵I-[Bpa¹]AngII within amino acids 3-30 of AT₂ receptor. Treatment of ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII-AT₂ receptor complex with cyanogen bromide produced two major receptor fragments of 3.6 kDa and 2.6 kDa. Cyanogen bromide hydrolysis of a mutant AT₂ receptor, produced two major fragments of 12.6 kDa and 2.6 kDa defining the labeling site of ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII within residues 129-138 of AT₂ receptor. Our results indicate that the amino-terminal tail of the AT₂ receptor interacts with the amino-terminal end of AngII whereas the inner half of the third transmembrane domain of AT₂ receptor interacts with the carboxyl-terminal end of AngII.

INTRODUCTION

The octapeptide angiotensin II (AngII)¹ recognizes two distinct types of receptors on target cells: the type 1 receptor (AT₁) and the type 2 receptor (AT₂). The AT₁ receptor mediates all the known physiological actions of AngII including regulation of blood pressure and of water and electrolyte balance (1). The functional roles of the AT₂ receptor are not well defined yet but recent studies suggest that it could act as a physiological antagonist of AT₁-mediated pressor effect and also regulate central nervous system functions related to locomotion and exploratory behavior (2, 3). Other studies also suggest that the AT₂ receptor inhibits cell proliferation and induces cell death (4, 5). AT₁ and AT₂ receptors have been cloned from several species. They are members of the G protein-coupled receptor superfamily, which is characterized by seven putative transmembrane helices. AT₁ and AT₂ receptors display a low degree (33%) of amino acid sequence similarity (6-9).

The elucidation of primary structures of numerous G protein-coupled receptors has prompted investigators to look for and identify domains in receptors directly involved in ligand binding. Most of this work was done on members of the β -adrenergic receptor family which bind bioamines (< 0.2 kDa) in the outer third of the plasma membrane between transmembrane helices (10). Ligand-binding domains have also been identified for larger agonist (>10 kDa) such as thyroid stimulating hormone and follicle stimulating hormone which bind to the extracellular amino-terminal region of their G protein-coupled receptors (11). The ligand-binding domains of G protein-coupled receptors for small bioactive peptides (0.5-5 kDa) have not been fully characterized. Recent studies suggest, however, that certain proximal loop regions as well as transmembrane regions may be important binding determinants (12-16).

The localization of ligand-binding domains in the G protein-coupled receptor family has been mostly studied using approaches such as, site-directed mutagenesis, deletion analysis, and construction of chimeric receptors (17). Since these mutations may affect hormone binding indirectly by altering the conformation of a receptor or its expression at the plasma membrane, a more direct approach for the identification of the AT₂ receptor ligand-binding domains should be envisaged. We previously reported the covalent labeling of the AT₂ receptor with the photoreactive AngII analog [Bpa⁸]AngII (18-20). In the present study, another high affinity photoreactive analog was prepared by replacing the amino-terminal end of AngII with Bpa. These two photoreactive AngII analogs were used to label the AT₂ receptor of PC-12 cells. The peptide-binding domains of the receptor were identified with each ligand after targeted enzymatic and chemical fragmentation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials— Bovine serum albumin (BSA), bacitracin, soybean trypsin inhibitor and cyanogen bromide (CNBr) were from Sigma Chemical co. (St-Louis, MO, U.S.A.). L-158,809 and PD 123319 were generous gifts from Merck and Parke-Davis Warner-Lambert, respectively. Glycopeptidase-F (PNGaseF) (EC 3.5.1.52), V8 protease (EC 3.4.21.19), endoproteinase Lys-C (endo Lys-C) (EC 3.4.21.50) and tissue kallikrein (EC 3.4.21.35) were from Boehringer Mannheim. The cDNA clone of the rat AT₂ receptor subcloned in the mammalian expression vector pcDNA1 was kindly provided by Dr. K.J. Catt (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Lipofectamine and culture media were obtained from GIBCO Life Technologies (Gaithersburg, MD). [Bpa¹]AngII and [Bpa⁸]AngII were synthesized in our laboratories by the solid phase method and purified by high performance liquid chromatography (HPLC) as described (21). ¹²⁵I-AngII, ¹²⁵I-[Bpa¹]AngII and ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII (specific radioactivities ~1000 Ci/mmol) were prepared with iodogen as described by Fraker and Speck (22). Briefly, 50 µl of the peptide solution (0.2 mM) was incubated with 5 µg Iodogen (Pierce Chemical), 1 mM Na¹²⁵I (2200 Ci/mmol), 10 µl of acetic acid (2 M) and 30 µl of water for 30 min at room temperature. The labeled peptides were purified by HPLC on a C-18 column (10 µm) (Allteck Associates Inc.; no. 29004) with a 20-40% acetonitrile gradient. The specific radioactivity of the labelled hormones was determined by self-displacement and saturation binding analysis.

Site-Directed Mutagenesis— pcDNA1 containing the rat AT₂ receptor cDNA clone was digested with HindIII and XbaI endonucleases and cloned into M13mp18 also digested with HindIII and XbaI. The codon change in the rat AT₂ cDNA was made by site-directed mutagenesis using an in vitro mutagenesis kit (Sculptor, Amersham). One oligonucleotide was constructed to induce a mutation at methionine 116. The mutagenic primer is listed below (altered nucleotide is underlined): methionine 116 to leucine (rAT₂M116L): 5-

GGCTCTTTGGACCTGTGCTGTGCAAAGTGT-3. After confirmation of site-directed mutation by DNA sequencing, the rAT₂M116L gene was excised from the M13mp18RF form by digestion with HindIII and XbaI and subcloned into the multiple cloning site of pcDNA3 that had been digested by these same restriction enzymes.

Transfection of COS-7 Cells— COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine and 10% (v/v) fetal bovine serum. Cells were seeded into 75 cm² culture dishes at a density of 25 000 cells/cm². When cells reached ~50% confluency, they were washed once with serum-free DMEM and transfected with 4 µg of plasmid DNA and 30 µl of Lipofectamine in 8 ml of serum-free DMEM. The cells were incubated for 5 h at 37 °C and the media were replaced with a complete DMEM medium containing 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Transfected cells were grown for 48-72 h before photoaffinity labeling and binding assays.

Cell Culture— PC-12 cells between the second and the fifteenth passages were used in all experiments. Cells were seeded into 75 cm² culture dishes at a density of 25 000 cells/cm² and grown in DMEM with 10% (v/v) fetal bovine serum, 50 IU/ml penicillin, 60 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine. Cells were kept in culture at 37 °C, in a CO₂ incubator, and the medium was changed daily or every other day depending on the state of confluency.

Binding Assays— Cell membrane preparation and binding assays were performed as previously described (19, 20).

Photoaffinity Labeling— Transfected COS-7 cells and PC-12 cells (~1 x 10⁷) were incubated in 4 ml of binding medium containing the photoreactive radioligands (6 nM), in the presence of L-158,809 (1 µM) (an AT₁ selective non peptide analog). After 45 min at room temperature, cells were washed with 20 ml of ice-cold binding medium (without BSA) and

irradiated for 60 min at 0 °C under filtered UV light (365 nm) (mercury vapor lamp serial no. JC-Par-38 from Westinghouse and Raymaster black light filters no. 5873 from Gates and Co. Inc. Long Island, NY, U.S.A.). Cells were then gently scraped with a rubber policeman and centrifuged (200 x g) for 10 min at 4 °C. The pellet was solubilized in a buffer containing 100 mM Na₂HPO₄, pH 8.5, 25 mM EDTA, 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 1 % (v/v) Nonidet P-40. After centrifugation (13 000 x g for 10 min at 4 °C), the supernatants were kept at -80 °C until further analysis.

Partial Purification of the Labeled Complex— The solubilized photolabeled receptors were diluted with an equal volume of 2X loading buffer (120 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % (v/v) glycerol, 4 % (w/v) SDS, 200 mM dithiothreitol and 0.05 % (w/v) bromophenol blue) and incubated for 2 h at 37 °C. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed as described by Laemmli (23) using 1.5-mm 8% gels. The gel was then dried and exposed to X-ray film (Kodak XAR-5) with an intensifying screen. The labeled proteins were isolated from the preparative gel using a passive elution protocol similar to that described by Blanton and Cohen (24). After autoradiography, radioactive bands were excised from dried gels and rehydrated with appropriate digestion buffer. The gel slices were macerated and eluted with 2 ml of buffer for three to four days at 4 °C under gentle agitation. Under these conditions we repeatedly recovered at least 80 % of the initial radioactivity. The eluted proteins were filtered (Acrodisc 0.22 µm; Gelman Sciences) and the gel slices were washed with 10 ml of digestion buffer. The whole eluate (12-15 ml) was concentrated approximately 150 times using Centriprep-10 and Centricon-10 (Amicon) and the partially purified proteins were aliquoted in fractions of 2-4 x 10⁵ cpm, lyophilized, and kept at -80 °C.

Endoglycosidase Digestion— Partially purified photolabeled receptors were resuspended in digestion buffers containing 0.2% (v/v) Nonidet P-40. PNGase-F (33-100 U/ml) was added and samples were incubated for different periods of time as indicated.

Protease Digestion— The partially purified photolabeled receptors (10 000- 300 000 cpm) were resuspended in 25 µl of digestion buffer containing 100 mM NH_4HCO_3 , pH 8.0 and 0.1% (w/v) SDS. Under these conditions V8 protease is known to cleave at the carboxyl-terminal side of glutamate residues. Samples were incubated for three to four days at room temperature with indicated amounts of V8 protease. Partially purified photolabeled receptors (10 000- 300 000 cpm) were also digested for 18-24 h at 37 °C with indicated amounts of endo Lys-C in 25 µl of digestion buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA and 0.1% (w/v) SDS. For kallikrein digestions, photolabeled receptors (~20-50 µg of proteins) were resuspended in 25 µl- 50 µl of digestion buffer containing 100 mM Na_2HPO_4 , pH 8.5, 25 mM EDTA, 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 0.1 mg/ml of L-1-chloro-3-(4-tosylamido)-4-phenyl-2-butanone (TPCK) and 0.2 % (v/v) Nonidet P-40. Indicated amounts of kallikrein were added and samples were incubated for 2 h at 37 °C. All digestions were terminated by adding an equal volume of 2X loading buffer (previously described) and boiling the samples for 3 min. When subsequent digestions were needed, products of the first digestion were identified by SDS-PAGE and autoradiography and recovered from non fixed gels by passive elution for 12-18 h at 37 °C with 200-400 µl of digestion buffer. Extracted proteins were lyophilized and submitted to chemical or enzymic digestion as described.

Chemical Digestion— For CNBr hydrolysis, partially purified photolabeled receptors (60 000- 450 000 cpm) were resuspended in 50 µl of 70% (v/v) trifluoroacetic acid and CNBr (50 µl) was added to a final concentration of 100 mg/ml. Samples were incubated at room temperature, in the dark, for 24-36 h. Reactions were terminated by adding 500 µl of water. Samples were lyophilized, resuspended in denaturing buffer and analyzed by SDS-PAGE.

Analysis of Products of Proteolysis and Chemical Cleavage— The products of proteolysis and chemical cleavage were analysed by SDS-PAGE using 16.5% acrylamide Tris-Tricine gels (BioRad) followed by autoradiography on X-ray films (Kodak XAR-5). ^{14}C -labeled low molecular protein standards (Gibco BRL) were used to determine apparent molecular masses. Running conditions, fixation and coloration of gels were performed accordingly to manufacturer's instructions.

RESULTS

Specificity of Photoreactive Analogs in Binding Experiments and Photoaffinity Labeling—

Fig. 1 shows the primary structures of AngII and photoreactive AngII analogs used in this study. Asp¹ and Phe⁸ were respectively replaced by Bpa to give [Bpa¹]AngII and [Bpa⁸]AngII. In competitive binding assays, [Bpa¹]AngII and [Bpa⁸]AngII exhibited high affinities for AT₂ receptor of PC-12 cells with respective IC₅₀s of 1.07 ± 0.38 nM and 0.37 ± 0.21 nM, comparable to that of AngII (0.40 ± 0.10 nM) (mean \pm S.D. of three experiments). In photoaffinity labeling experiments (fig. 2), ¹²⁵I-[Bpa¹]AngII (lane 1) and ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII (lane 4) specifically labeled the AT₂ receptor which migrated as a glycoprotein of 140 kDa as previously described (19, 20). The labeling of the AT₂ receptor by the two photoreactive analogs was completely abolished by PD123319 (10 μ M) (an AT₂ receptor selective ligand) (lanes 2 and 5) and by AngII (1 μ M) (lanes 3 and 6) thereby confirming the specificity and the selectivity of the labeling. Although both photoreactive analogs successfully labeled the AT₂ receptor, determination of covalent incorporation yields (calculated from the ratio of total radioactivity found in isolated bands to total specific binding observed before photolysis) revealed that ¹²⁵I-[Bpa¹]AngII, with a ~10% yield of covalent incorporation, was approximately six time less effective than ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII (~60% yield of covalent incorporation). These differences are well illustrated in fig. 2 where the intensity of ¹²⁵I-[Bpa¹]AngII labeling (lane 1) is clearly weaker than that of ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII labeling (lane 4). It indicates that ¹²⁵I-[Bpa¹]AngII and ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII interact distinctly with the AT₂ receptor.

¹²⁵I-[Bpa¹]AngII and ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII Label the Amino-Terminal Portion of the AT₂

Receptor— Tissue kallikrein is a serine protease that cleaves after phenylalanine-arginine or leucine-arginine amino acid combinations. The AT₂ receptor contains only four of these amino acid combinations, including one located precisely halfway in the receptor molecule at

arginine 182. The three other combinations are located in the carboxyl-terminal end of the molecule at arginines 330, 334, and 356 (fig. 3). Kallikrein-treated ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-AT₂ complex migrated with an M_r of 70 kDa (fig. 4A, lane 1). This receptor fragment was the final digestion product since prolonged incubation with kallikrein (fig. 4A, lanes 3 and 5) did not reveal any lower molecular weight fragment. As shown in fig. 3, the AT₂ receptor is N-glycosylated exclusively in its amino-terminal extracellular tail (6, 7). The relatively high M_r of the 70 kDa digestion product and its glycoprotein-like migration behavior (broad band) suggest that it corresponds to the labeled 1-182 fragment of the AT₂ receptor. To confirm the location of the 70 kDa receptor fragment, kallikrein-treated ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-AT₂ complex was deglycosylated with PNGase-F. Under these conditions a labeled fragment of 18 kDa was produced (fig. 4B, lane 5). This deglycosylation fragment exhibited about half the size of the non kallikrein-treated deglycosylated AT₂ receptor (M_r of 35 kDa) (lane 3). Identical results were obtained with AT₂ receptor labeled with ^{125}I -[Bpa¹]AngII. Together, these results show that ^{125}I -[Bpa¹]AngII and ^{125}I -[Bpa⁸]AngII are labelling sites within the first 182 residues of the AT₂ receptor.

Mapping the ^{125}I -[Bpa¹]AngII Binding Domain— After photolabeling with ^{125}I -[Bpa¹]AngII, AT₂ receptor was partially purified and digested with endo Lys-C which cleaves on the carboxy-terminal side of lysine residues. The digestion product migrated as a broad band of ~80 kDa (fig. 5A, lane 2). Again the high M_r and the broadness of the band suggested a glycoprotein nature. After extraction of the endo Lys-C digestion product, treatment with PNGase-F resulted in a 4.6 kDa fragment which migrated as a sharp band suggesting that it was completely deglycosylated (fig. 5C, lane 2). Interestingly, similar results were obtained with a simplified protocol where the photolabeled AT₂ receptor was simultaneously digested with endo Lys-C and PNGase-F (fig. 5B, lane 2). Since as previously mentioned the AT₂ receptor is N-glycosylated exclusively in its amino-terminal ectodomain, the cleavage probably occurred at one of two lysine residues, located at positions

38 and 42 (fig. 3). Cleavage at these residues should produce either a 5.2 kDa fragment (including the photolabel of 1.3 kDa) that corresponds to the labeled 3-38 peptide or a 5.6 kDa fragment that corresponds to the labeled 3-42 peptide.

To further define the ^{125}I -[Bpa¹]AngII binding domain, the 4.6 kDa fragment obtained after co-digestion with endo Lys-C and PNGase-F was submitted to digestion with V8 protease. Fig. 6, lane 3 shows that, under these conditions, the 4.6 kDa fragment was converted to a 3.6 kDa fragment. The only site of cleavage for V8 protease within amino acids 3-42 is after glutamate 30 (fig. 3). Cleavage of the 4.6 kDa fragment at this site should produce either a labeled 2.6 kDa fragment (31-42 peptide + photolabel), a labeled 2.2 kDa fragment (31-38 peptide + photolabel) or a labeled 4.3 kDa fragment (3-30 peptide + photolabel) (fig. 3). Based on the relatively high M_r of the digestion product (3.6 kDa), the 3-30 peptide is clearly a better candidate than the 31-42 or 31-38 peptides for the binding domain of ^{125}I -[Bpa¹]AngII. This conclusion is further strengthened by experiments in which photolabeled-AT₂ receptor was co-digested with PNGase-F and V8 protease. Under these conditions, a 4.1 kDa fragment was obtained, locating the binding domain within the first 30 amino acids of the AT₂ receptor (results not shown). Together these results show that ^{125}I -[Bpa¹]AngII is labeling a site within residues 3-30 of the extracellular amino-terminal tail of the AT₂ receptor (fig. 10).

Mapping the ^{125}I -[Bpa⁸]AngII Binding Domain— ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-photolabeled AT₂ receptor was partially purified and digested with V8 protease. The patterns of fragmentation were clearly distinct from those obtained with ^{125}I -[Bpa¹]AngII-AT₂ complex. Digestion with V8 protease produced a 28 kDa and a 15.2 kDa fragments (fig. 7, lane 2). Deglycosylation had no effect on the mobility of the 15.2 kDa fragment indicating that it was not a glycosylated fragment (result not shown). Knowing that the binding domain of ^{125}I -[Bpa⁸]AngII is located within amino acids 1-182 (fig. 4) and that the 15.2 kDa digestion

product is not glycosylated, the fragment located between alanine 46 and glutamate 188 (estimated molecular mass of the peptide + photolabel: 17.8 kDa) is the best candidate for the binding domain of ^{125}I -[Bpa⁸]AngII (fig. 3). Prolonged incubations in the presence of PNGase-F reduced the proportion of the 28 kDa fragment and increased the proportion of a fragment migrating close to the 15.2 kDa fragment suggesting that the 28 kDa fragment is the glycosylated 31-188 peptide of AT₂ receptor, containing a putative site of glycosylation at asparagine 34 (fig. 3).

To further define the ^{125}I -[Bpa⁸]AngII binding domain, photolabeled AT₂ receptor was submitted to hydrolysis with CNBr which cleaves specifically at the carboxyl-terminal side of methionine residues. Fig. 8, lane 2 shows that, under these conditions, two major digestion products of 3.6 kDa and 2.6 kDa were obtained. These results suggest that the photolabel binds to 117-138 peptide (estimated M_r of 3.7 kDa, including the photolabel) in the third transmembrane domain of AT₂. Hydrolysis at methionine 128 of this peptide would produce two fragments of comparable apparent sizes (estimated size of 2.6 kDa and 2.4 kDa for 117-128 peptide and 129-138 peptide, respectively). In order to confirm this hypothesis and to identify the 2.6 kDa fragment, we generated a mutant of the rat AT₂ receptor in which methionine 116 was replaced by a leucine, therefore abolishing that putative CNBr cleavage site. In competitive binding assays, AngII exhibited a similar affinity for wild-type (IC_{50} of 0.34 ± 0.03 nM; mean \pm S.D. of three experiments) and mutant rAT₂M116L (0.37 ± 0.17 nM) receptors expressed in COS-7 cells. [Bpa⁸]AngII displayed also comparable binding affinities for the wild-type (0.31 ± 0.26 nM) and the mutant (0.23 ± 0.15 nM) receptors. The wild-type and the mutant rAT₂M116L receptors were photolabeled with ^{125}I -[Bpa⁸]AngII, partially purified and submitted to hydrolysis by CNBr. Fig. 9, lane 1 shows that CNBr hydrolysis of the wild-type AT₂ receptor produced the previously described 3.6 kDa and 2.6 kDa fragments. CNBr hydrolysis of the rAT₂M116L receptor still produced the 2.6 kDa fragment and a longer 12.6 kDa fragment (fig. 9, lane 3). Under these conditions the only

possibility is that the 2.6 kDa fragment is the 129-138 peptide located in the inner half of the third transmembrane domain of mutant AT₂ receptor. Indeed, if labeling had occurred between leucine 116 and methionine 128 in the mutant receptor, exclusively higher M_r labeled receptor fragments (13-15 kDa) would have been produced. The 12.6 kDa fragment produced by CNBr hydrolysis of rAT₂M116L most probably corresponds to the mutant receptor 54-138 peptide (estimated molecular mass of the peptide + photolabel: 10.9 kDa). The incomplete CNBr hydrolysis of both native and mutant receptors suggest that cleavage at methionine 128 is impaired. This may result from reduced solubility of the protein in strong dissociating agents (like trifluoroacetic acid), sterical masking of the methionine residue by surrounding amino acids or oxidation of the methionine residue occurring during protein manipulations and/or acid hydrolysis (25). Together these results show that ¹²⁵I-[Bpa⁸]AngII is labeling a site within residues 129-138 of AT₂ receptor (fig. 10).

DISCUSSION

Our results indicate that, upon binding, the amino-terminal tail of the AT₂ receptor interacts with the amino-terminal end of AngII whereas the inner half of the third transmembrane domain of AT₂ receptor interacts with the carboxyl-terminal end of AngII. To our knowledge, this is the first study providing data on the binding domains of the AT₂ receptor. Our results and those of other groups suggest that there may be a common scheme for the binding domains of small peptide hormones in the G-protein coupled receptor superfamily. For example, it has been shown that charged residues in the second and third extracellular loops of the AT₁ receptor are major docking points for the amino-terminal end (Asp¹ and Arg² residues respectively) of AngII (13, 26). On the other hand, the hydrophobic nature of the phenyl group at position 8 in the AngII molecule (the carboxyl-terminal end of the peptide) suggests that its site of interaction with the AT₁ receptor is within the membrane. Actually, recent studies suggest that upon binding, the carboxyl-terminal end of the AngII molecule occupies a space between helices III, V, VI and VII of the AT₁ receptor (26, 27). Similarly, binding domains for the undecapeptide substance-P (SP) were identified in the first and the second extracellular loops, the amino-terminal ectodomain and the outer half of the transmembrane helices II and VII of the NK-1 receptor (14, 15, 28). In an elegant study using photoreactive analogs of SP, Li et al. (15) have shown that the amino-terminal side (the fourth position) of the ¹²⁵I-[Tyr¹, Bpa⁴]SP peptide interacts with the extracellular amino-terminal tail of the NK-1 receptor while the C-terminal side (the ninth position) of the ¹²⁵I-[Tyr¹, Bpa⁹]SP peptide interacts with the second extracellular loop. The authors proposed a model in which the carboxyl-terminal end of the peptide positions itself between helices in the outer part of the plasma membrane whereas the amino-terminal portion of the peptide is stabilized by ectodomains of NK-1 receptor. Based on our results, it is tempting to propose that the AngII molecule binds the AT₂ receptor in a similar fashion, with the carboxyl-terminal end sitting deep within the transmembrane domains and the amino-terminal end

interacting with the ectodomains of the receptor. The location of the carboxyl-terminal portion of AngII deep in the plasma membrane fits well with known pharmacological properties of AngII. The agonistic nature of AngII is conferred by its carboxyl-terminal phenylalanine residue (29) and intrahelical amino acids are known to play a major role in G-protein coupled receptor activation upon direct interaction with ligands (10). Our results also suggest that the carboxyl-terminal end of AngII interacts with the third transmembrane domain of the AT₂ receptor. Similarly, it has been shown residues in the third transmembrane domain of the AT₁ receptor are required for high affinity binding (16, 30). Our results also raise another interesting point. If the AngII molecule interacts at the same time with residues in the amino-terminal extracellular tail as well as residues deeply located in the third transmembrane domain, one could speculate that the ectodomain must lie near the outer membrane surface. The AngII molecule has an estimated length of about $\sim 30 \text{ \AA}$ (probably less in solution) which is shorter than a transmembrane helix ($\sim 40 \text{ \AA}$). To account for such a requirement, the putative disulfide bridge located between the amino-terminal tail and the third extracellular loop of the AT₂ receptor may play an important conformational role in bringing the amino-terminal tail in close proximity to the plasma membrane surface (fig. 10).

In conclusion, we have identified two peptide-binding regions in the AT₂ receptor with the use of highly potent and specific AngII photoreactive analogs. This approach also allowed the determination of the AngII molecule's orientation in its binding pocket. Based on the results, we conclude that AngII interacts with an extracellular segment and a transmembrane helix of AT₂ receptor. This interaction pattern, also found in other G-protein coupled receptors for small bioactive peptides, may correspond to a highly conserved feature among this very large family of receptors. By recovering large amounts of labeled receptor, it will be possible to sequence the fragments and pin point the precise interaction sites.

REFERENCES

1. Peach, M.J. (1981) *Biochem. pharmacol.* **80**, 2745-2751
2. Hein, L., Barsh G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J., and Kobilka, B.K. (1995) *Nature* **377**, 744-747
3. Ichiki, T., Labosky, P.A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B.L.M., and Inagami, T. (1995) *Nature* **377**, 748-750
4. Stoll, M., Steckelings, M., Paul, M., Bottari, S.P., Metzger, R., and Unger, T. (1995) *J. Clin. Invest.* **95**, 651-657
5. Yamada, T., Horiuchi, M., and Dzau, V.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 156-160
6. Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, Y., and Inagami, T. (1991) *Nature* **351**, 230-232
7. Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, M.S., Runge, M.S., and Bernstein, K.E. (1991) *Nature* **351**, 233-236
8. Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., and Inagami, T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24543-24546

9. Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24539-24542
10. Strader, C.D., Ming Fong, T., Tota, M.R., and Underwood, D. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101-132
11. Bockaert, J. (1991) *Curr. Opinion Neurobiol.* **1**, 32-42
12. Noda, K., Saad, Y., and Karnik, S.S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28511-28514
13. Feng, Y.-H., Noda, K., Saad, Y., Liu, X.-p., Husain, A., and Karnik, S.S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12846-12850
14. Fong, T.M., Huang, R.R.-C., and Strader, C. D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 25664-25672
15. Li, Y.-M., Marnerakis, M., Stimson, E.R., and Maggio, J.E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1213-1220
16. Monnot, C., Bihoreau, C., Conchon, S., Curnow, K.M., Corvol, P., and Clauser, E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1507-1513
17. Ostrowski, J., Kjelsberg, M.A., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 167-183
18. Servant, G., Boulay, G., Bossé, R., Escher, E., and Guillemette, G. (1993) *Mol. Pharmacol.* **43**, 677-683

19. Servant, G., Dudley, D.T., Escher, E., and Guillemette, G. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 1112-1118
20. Servant, G., Dudley, D.T., Escher, E., and Guillemette, G. (1996) *Biochem. J.* **313**, 297-304
21. Bossé, R., Servant, G., Zhou, L.-M., Guillemette, G., and Escher, E. (1993) *Regul. Pept.* **44**, 215-223
22. Fraker, P.J., and Speck, J.C. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-857
23. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-683
24. Blanton, M.P., and Cohen, J.B. (1994) *Biochemistry* **33**, 2859-2872
25. Parish, C.R., and Ada, G.L. (1969) *Biochem. J.* **113**, 489-499
26. Hunyady, L., Balla, T., and Catt, K.J. (1996) *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 135-140
27. Yamano, Y., Ohyama, K., Kikyo, M., Sano, T., Nakagomi, Y., Inoue, Y., Nakamura, N., Morishima, I., Guo D.-F., Hamakubo, T., and Inagami, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14024-14030
28. Huang, R.-R.C., Yu, H., Strader, C.D., and Fong, T.M. (1994) *Biochemistry* **33**, 3007-3013

29. Regoli, D., Park, W.K., and Rioux, F. (1974) *Pharmacol. Rev.* **26**, 69-123
30. Groblewski, T., Maigret, B., Nouet, S., Larguier, R., Lombard, C., Bonnafous, J.-C., and Marie, J. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 153-160
31. Dormán G., and Prestwich, G.D. (1994) *Biochemistry* **33**, 5661-5673

Footnotes— This work is part of the Ph.D. thesis of G.S. and it was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRCC) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). G.S. is the recipient of a studentship from MRCC-Ciba-Geigy. S.A.L. is the recipient of a studentship from HSFC. E.E. is the recipient of a J.C. Edwards chair in cardiovascular research. G.G. is the recipient of an MRCC Scientist Award. R.L. is a scholar from the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec.

The abbreviations used are: AngII, angiotensin II; AT₁ and AT₂, angiotensin II type 1 and type 2 receptors; Bpa, *p*-benzoyl-L-phenylalanine; BSA, bovine serum albumin; CNBr, cyanogen bromide; Da, dalton; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; endo Lys-C, endoproteinase Lys-C; HPLC, high performance liquid chromatography; M_r, apparent molecular mass; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PNGase-F, glycopeptidase-F; SP, substance-P.

FIGURE LEGENDS

Fig.1. *A.* Amino acid sequence of AngII and photoreactive AngII analogs. Residues represented in bold characters correspond to amino acid modifications. *B.* Mechanism of covalent modification following photo activation. The absorption of a photon at ~ 350 nm by the Bpa moiety [1] results in the promotion of one electron from a nonbonding sp^2 -like n-orbital on oxygen to an antibonding π^* -orbital of the carbonyl group [2]. In the diradicaloid triplet state [2], the electron-deficient oxygen n-orbital is electrophilic and therefore interacts with weak C-H bonds [2] to produce benzpinacol-type compounds [3] (31).

Fig.2. Photoaffinity labeling of AT_2 receptor from PC-12 cells. After photolabeling, cellular proteins were solubilized, denatured and submitted to SDS-PAGE on a 8% acrylamide separating gel (40 μ g of protein/lane) followed by autoradiography. Lanes 1 to 3, ^{125}I -[Bpa¹]AngII-labeled proteins; lanes 4 to 6, ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-labeled proteins. Lanes 1 and 4, total labeling; lanes 2 and 5, labeling in the presence of PD 123319 (10 μ M); lanes 3 and 6, labeling in the presence of AngII (1 μ M). Protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments.

Fig.3. Two-dimensional representation of the primary structure of the rat AT_2 receptor and its potential sites of cleavage by specific proteases and CNBr. The space after residue 182 indicates a tissue kallikrein recognition site; arrows indicate recognition sites for V8 protease; bold circles indicate recognition sites for endo Lys-C; closed circles indicate sites of hydrolysis for CNBr. Putative sites of N-glycosylation on asparagines 4, 13, 24, 29 and 34 are also indicated.

Fig.4. Kallikrein digestion of ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-labeled AT₂ receptor. *A.* Photolabeled AT₂ receptor (50 μg of membrane protein) was solubilized and incubated in the absence (lanes 2,4 and 6) or the presence (lanes 1,3 and 5) of tissue kallikrein (50 μg) at 37 °C for 1 h (lanes 1 and 2), 3 h (lanes 3 and 4) and 5 h (lanes 5 and 6). Samples were run on a 8% acrylamide separating gel followed by autoradiography. Protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. *B.* ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-labeled AT₂ receptor (50 μg of membrane protein) (lane 1) was incubated for 2 h at 37 °C in the absence (lanes 2 and 3) or the presence (lanes 4 and 5) of tissue kallikrein (50 μg) before digestion with PNGase-F (33 U/ml) for 2 h at 37 °C (lanes 3 and 5). Samples were run on a 12% acrylamide separating gel followed by autoradiography. ^{14}C -labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of three separate experiments.

Fig.5. Endo Lys-C digestion of ^{125}I -[Bpa¹]AngII-labeled AT₂ receptor. *A.* Partially purified photolabeled AT₂ receptor (24 000 cpm) was incubated in the absence (lane 1) or the presence (lane 2) of endo Lys-C (2.5 μg) at 37 °C for 22 h. Samples were run on a 10% acrylamide separating gel followed by autoradiography. Protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of three separate experiments. *B.* Photolabeled receptor (47 000 cpm) was incubated with PNGase-F (100 U/ml) at room temperature for 24 h. The sample was aliquoted in two fractions one of which received digestion buffer (lane 1) and the other received 1.8 μg of endo Lys-C (lane 2). Incubation was prolonged for 22 h at 37 °C. Samples were run on a 16.5% acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C -labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of three separate experiments. *C.* Photolabeled receptor (100 000 cpm) was incubated with endo Lys-

C (1 μ g) for 20 h at 37 °C. The sample was run on a 8% acrylamide separating gel. The 80 kDa labeled receptor fragment was located and recovered by passive elution from gel slices. The receptor fragment (40 000 cpm) was incubated in the absence (lane 1) or the presence (lane 2) of PNGase-F (40 U/ml) for 2 h at 37 °C. Samples were run on a 16.5% acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography. 14 C-labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of two separate experiments.

Fig.6. V8 protease digestion of the 4.6 kDa 125 I-[Bpa¹]AngII-AT₂ receptor fragment. Partially purified photolabeled AT₂ receptor (200 000 cpm) was incubated with PNGase-F (100 U/ml) for 24 h at room temperature. Endo Lys-C (1 μ g) was added and the incubation was prolonged for 24 h at 37 °C. The sample was run on a 16.5% acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography. The 4.6 kDa labeled receptor fragment (lane 1) was located and recovered by passive elution from gel slices. The labeled receptor fragment (7 000 cpm) was incubated in the absence (lane 2) or the presence (lane 3) of V8 protease (7 μ g) for four days at room temperature. The samples were run on a 16.5% acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography. 14 C-labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of two separate experiments.

fig.7. V8 protease digestion of 125 I-[Bpa⁸]AngII-labeled AT₂ receptor. Partially purified photolabeled AT₂ receptor (250 000 cpm) was incubated in the absence (lane 1) or the presence (lane 2) of V8 protease (50 μ g) for four days at room temperature. Samples were run on a 16.5% acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography. 14 C-labeled protein standards of the indicated molecular masses

(kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments.

Fig.8. CNBr hydrolysis of ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-labeled AT₂ receptor. Partially purified photolabeled AT₂ receptor (66 000 cpm) was incubated in the absence (lane 1) or the presence (lane 2) of CNBr (100 mg/ml) for 36 h at room temperature in the dark. Samples were run on a 16.5% acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C -labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments.

Fig.9. CNBr hydrolysis of ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-labeled wild-type and mutant (rAT₂M116L) AT₂ receptor. Partially purified photolabeled wild-type and mutant rat AT₂ receptors (200 000 cpm) were incubated in the absence (lanes 2 and 4) or the presence (lanes 1 and 3) of CNBr (100 mg/ml) for 24 h at room temperature in the dark. Samples were run on a 16.5% acrylamide Tris-Tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C -labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. Lanes 1 and 2, ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-wild-type rat AT₂ receptor; lanes 3 and 4, ^{125}I -[Bpa⁸]AngII-rAT₂M116L. These results are representative of three separate experiments.

Fig.10. Two-dimensional representation of the primary structure of the rat AT₂ receptor and its AngII binding domains. The ligand binding domains are represented by closed circles: the amino-terminal end of AngII interacts with the extracellular amino-terminal tail within residues 3-30; the carboxyl-terminal end of AngII interacts with the third transmembrane domain within residues 129-138. Solid lines indicate putative disulfide bridges between cysteines 35 and 290 and between cysteines 117 and 195.

A

Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Val⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸

Sar¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Val⁵-His⁶-Pro⁷-L-Bpa⁸

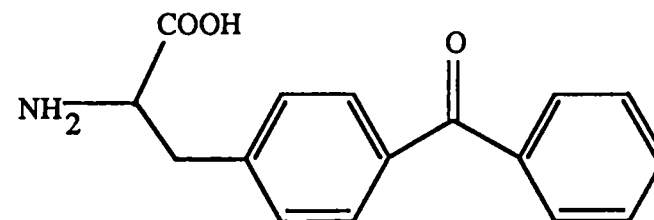
L-Bpa¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Val⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸

AngII

[Bpa⁸] AngII

[Bpa¹] AngII

Bpa =



B

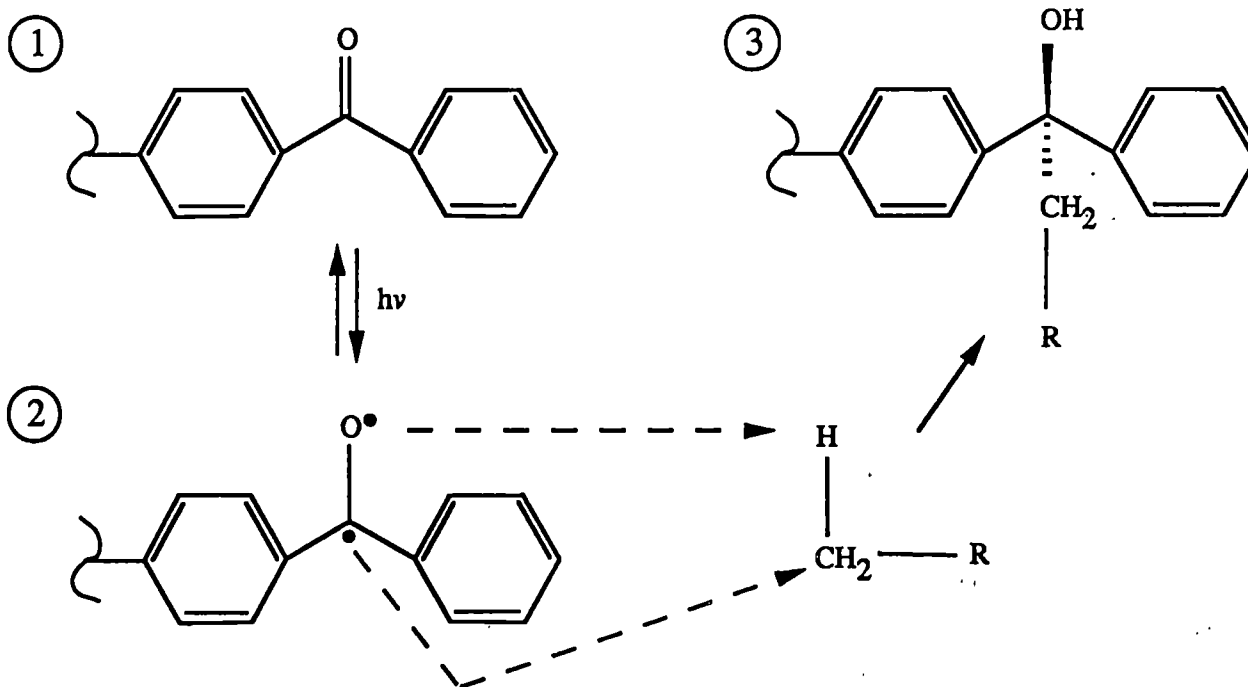


Fig 1 Servant et al.

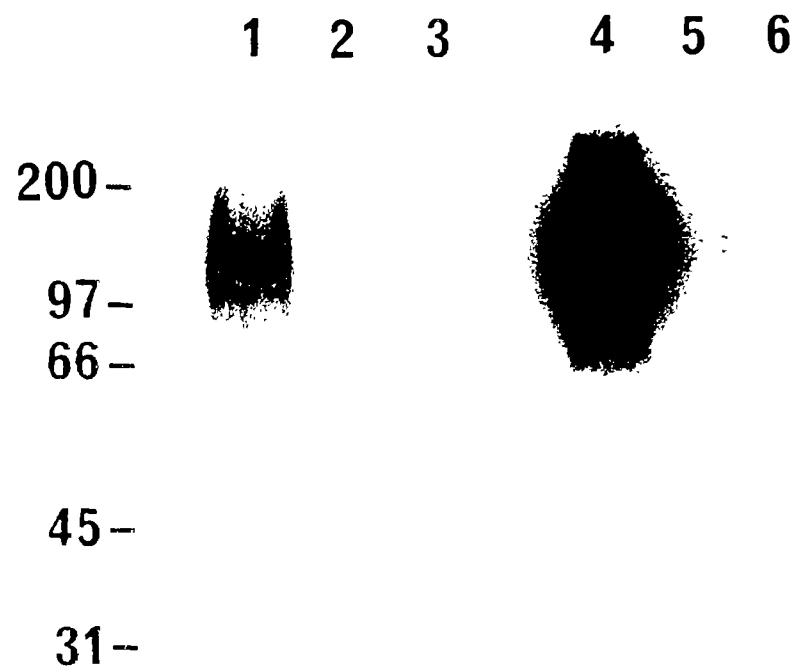


Fig 2 Servant et al. --

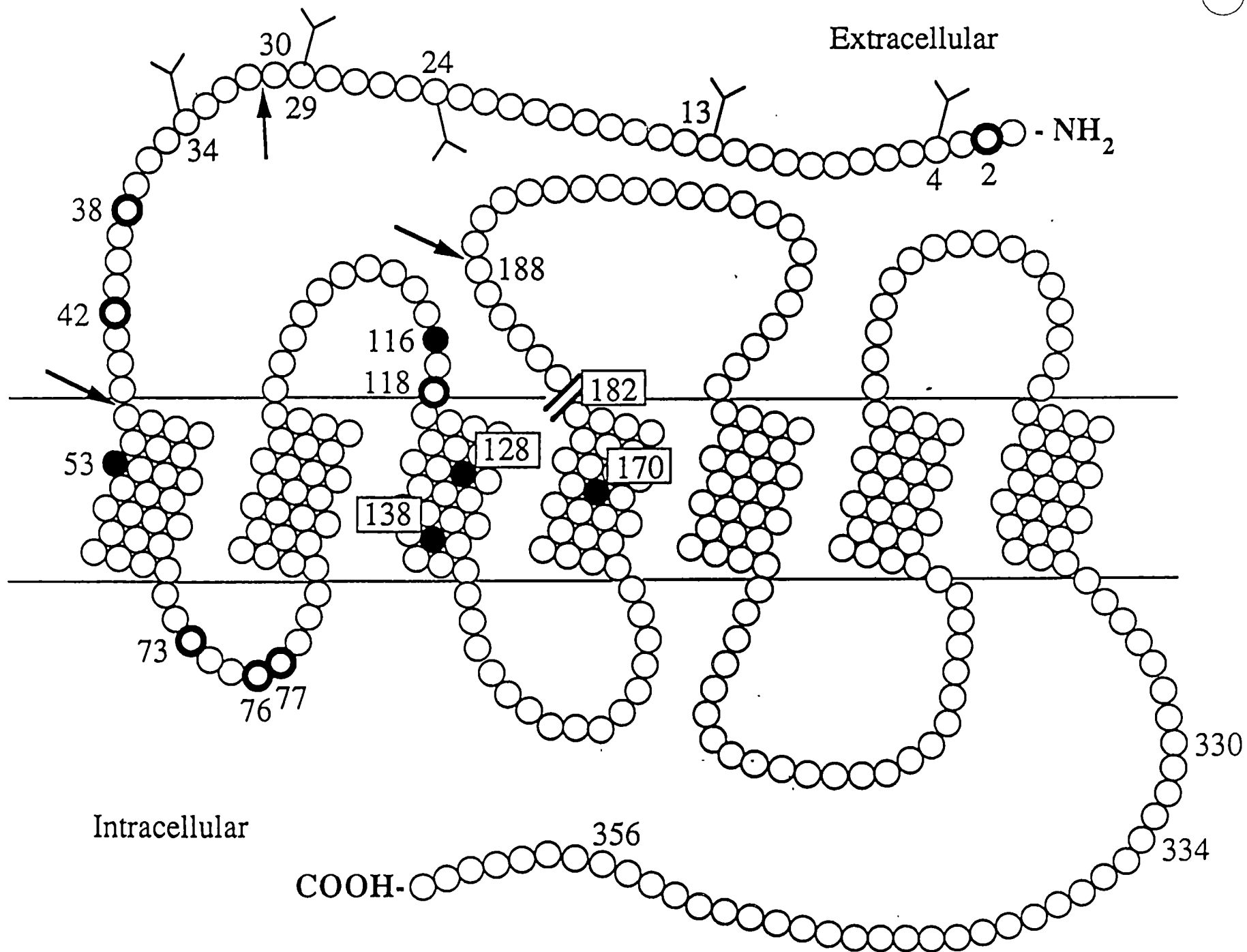


FIG 3 Servant et al.

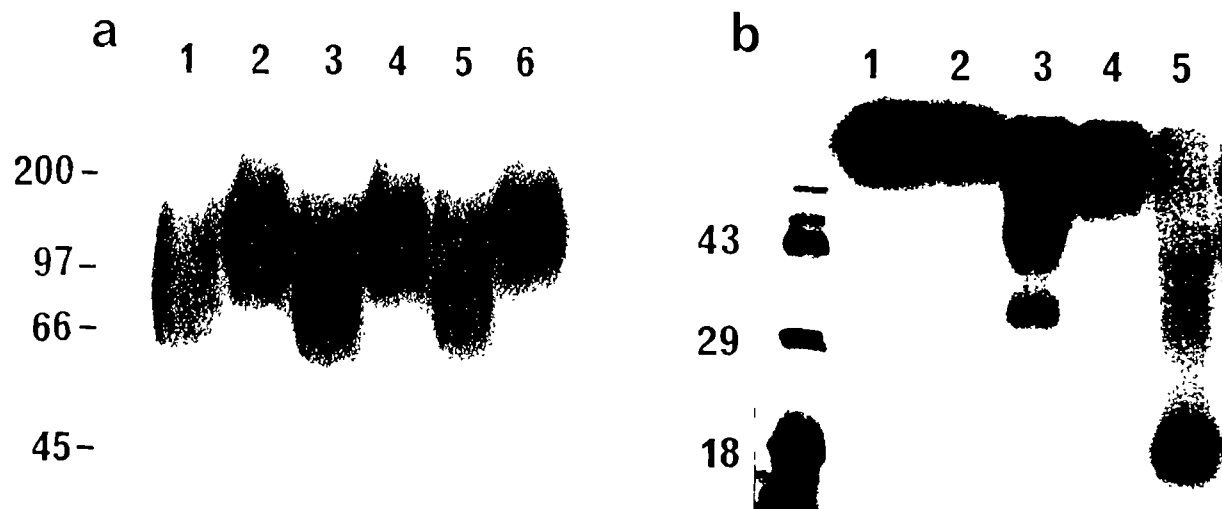


Fig 4 Servant et al.

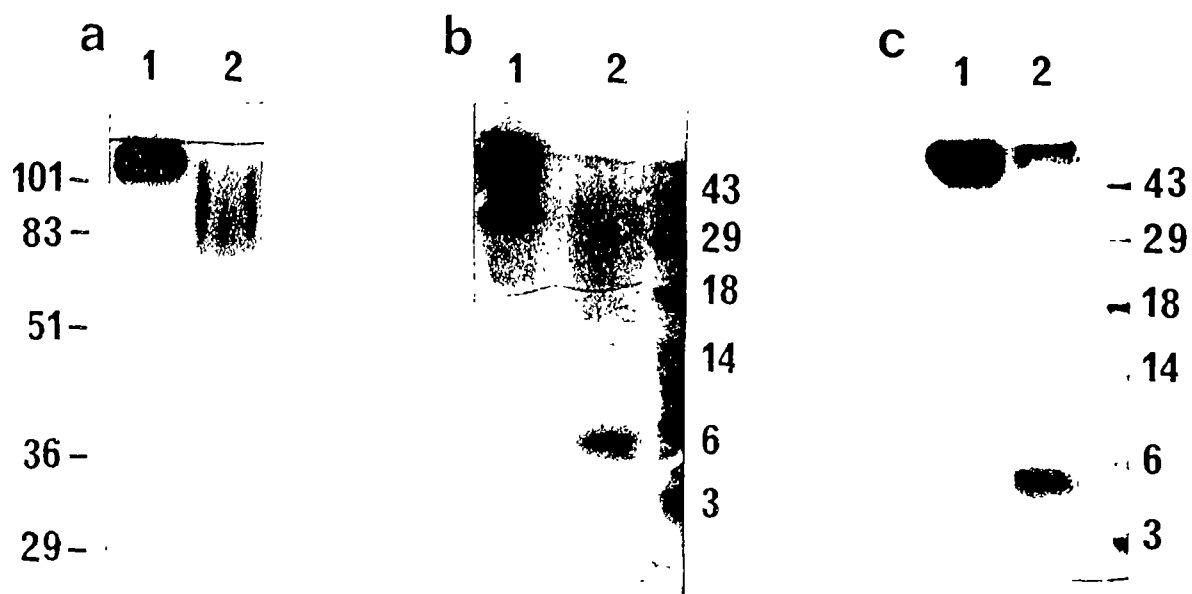


Fig 5 Servant et al.

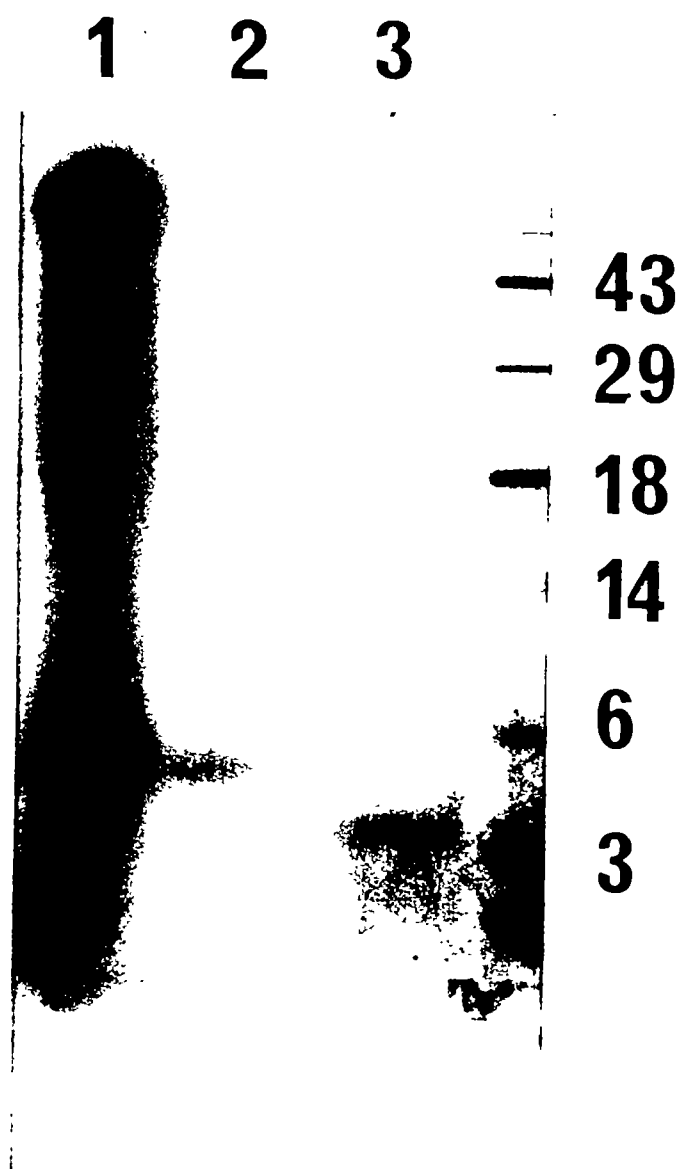


Fig 6 Servant et al.



Fig 7 Servant et al.

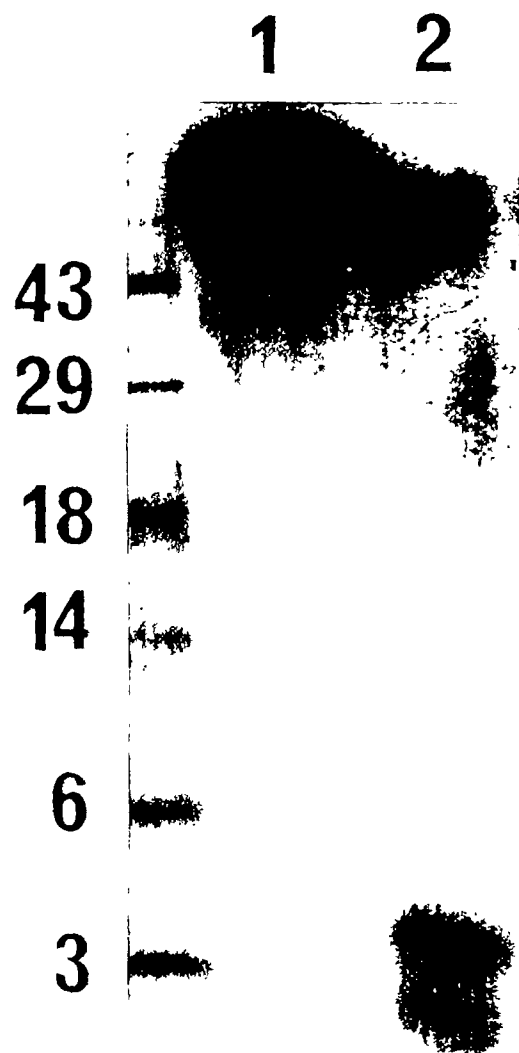


Fig 8 Servant et al.

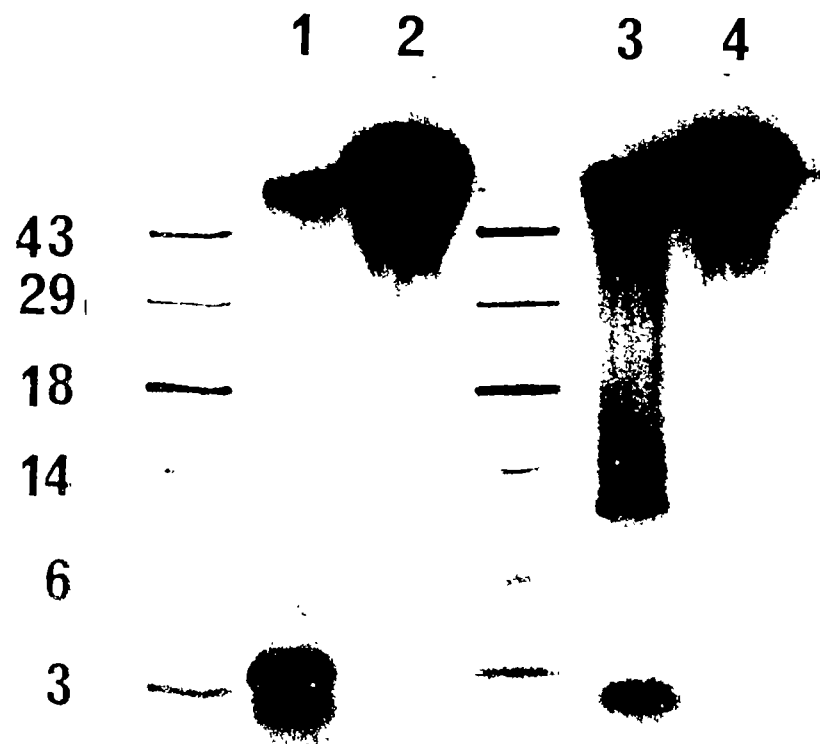


Fig 9 Servant et al.

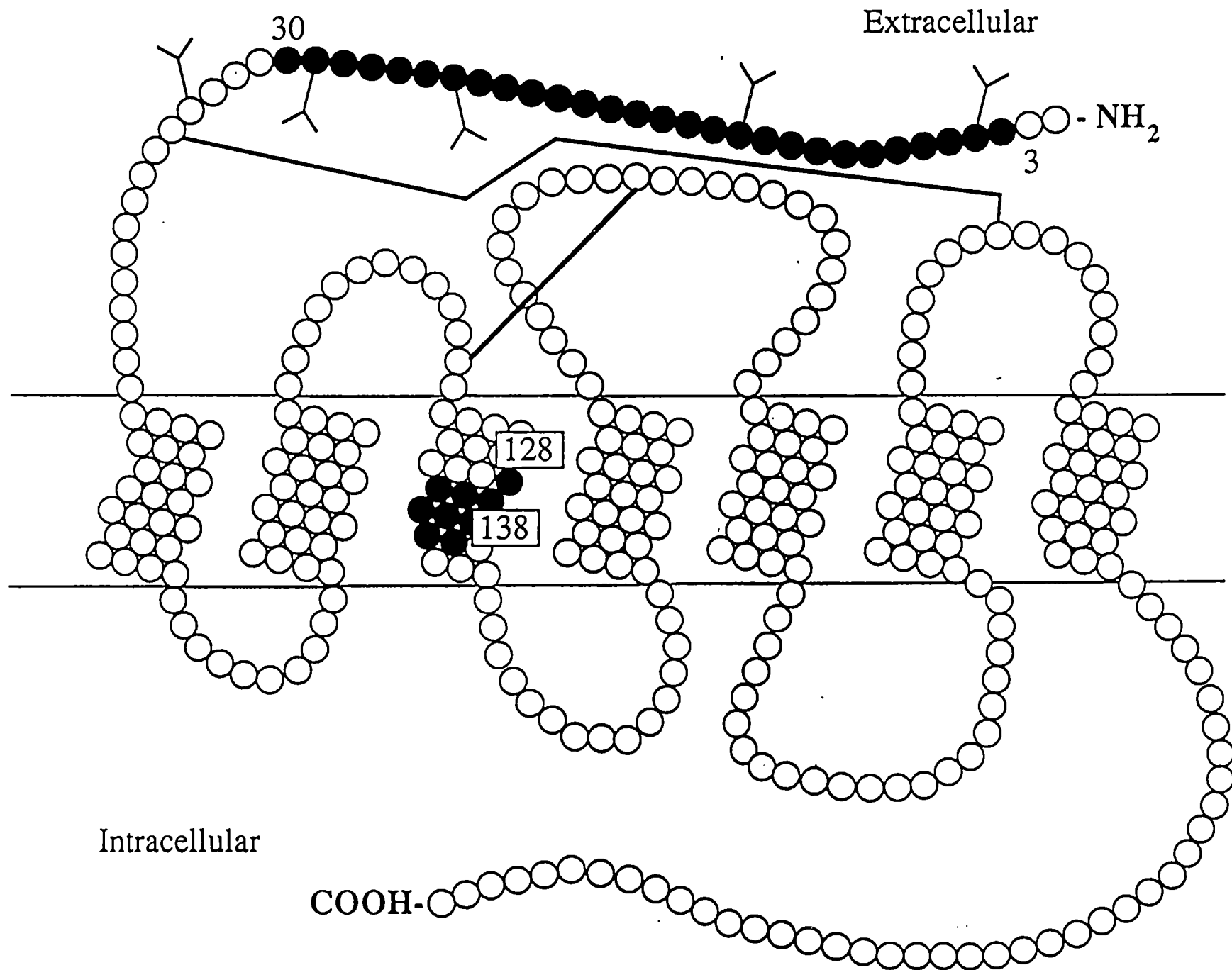


Fig 10 Servant et al.

DISCUSSION

Le développement d'analogues non-peptidiques de l'AngII à la fin des années 80 a permis l'identification des récepteurs AT₁ et AT₂. Cette découverte a relancé les recherches dans le domaine du système rénine-angiotensine. Un effort important a donc été fourni pour déterminer les rôles et mécanismes d'action de ces récepteurs. Ces recherches ont permis de conclure que le récepteur AT₁ médie la totalité des actions physiologiques connues de l'hormone. D'autre part, en utilisant la méthode du clonage par expression, la séquence primaire du récepteur AT₁ a été identifiée en 1991 (MURPHY *et al.*, 1991; SASAKI *et al.*, 1991). La séquence protéique de ce récepteur nous a révélé qu'il fait partie de la grande famille des récepteurs à 7DTM couplés aux protéines G. Par contre, le récepteur AT₂ s'est rapidement avéré une énigme tant par sa distribution particulière au niveau de l'organisme que par l'absence apparente de couplage aux mécanismes de transduction signalitiques classiques. Malgré un travail soutenu ce récepteur est demeuré longtemps peu caractérisé biochimiquement et les mécanismes transductionnels couplés à son activation sont toujours inconnus.

Afin d'élucider quelques propriétés biochimiques de ce site de liaison, nous avons opté pour l'utilisation d'analogues photosensibles de l'hormone dans des essais de marquage par photoaffinité. Cette technique a été grandement utilisée pour la caractérisation biochimique d'une multitude de récepteurs et autres protéines (SOKOLOVSKY, 1987; ESCHER, 1988; EBERLE *et al.*, 1989; INSEL, 1989; BATES *et al.*, 1990; RUAT *et al.*, 1991; DORMÁN & PRESTWICH, 1994; NAKANISHI *et al.*, 1995). Sa popularité, au détriment des agents de réticulation homo ou hétéro-bifonctionnels, est liée au fait qu'elle permet généralement l'obtention de rendements d'incorporation covalente plus élevés tout en diminuant la présence de marquage non-spécifique. Des fortes concentrations d'agents de réticulation sont généralement utilisées afin de maximiser la formation des complexes

ligand-récepteur. Dans ces conditions, il n'est pas rare d'observer la formation d'agrégats de protéines rendant ainsi difficile l'interprétation des résultats lors de l'analyse des complexes formés. La stratégie que nous avons choisie pour ce projet est l'utilisation de dérivés benzophénone (BP) de l'AngII. Les dérivés BP ont été largement utilisés au cours des dernières années pour la caractérisation de nombreuses protéines. Comparés aux autres groupements photosensibles tels les diazo esters, aryl azido et les diazirines, les dérivés BP présentent plusieurs avantages. Ils sont chimiquement plus stables et peuvent donc être manipulés à la lumière ambiante. De plus, ils peuvent être activés à 350-360 nm évitant ainsi les longueurs d'ondes dommageables pour les protéines. Enfin, ces composés réagissent préférentiellement avec les liens C-H et ce, même en présence d'eau ou de volumineux nucléophiles (DORMÁN & PRESTWICH, 1994).

L'utilisation d'un dérivé BP de haute affinité, le ^{125}I -AngII-Bpa⁸ a permis, lors des essais de marquage par photoaffinité, l'obtention de rendements de marquage élevés (70%) sur une préparation membranaire de myomètre humain. La nature irréversible de la liaison a été révélée par l'absence de dissociation en conditions acides et par l'électrophorèse en conditions dénaturantes. Ce rendement d'incorporation élevé est comparable à ceux obtenus par McNICOLL *et al.* (1992) et BOYD *et al.* (1991) qui ont utilisé des dérivés BP de l'ANF et de la SP pour marquer les récepteurs respectifs. La raison pour laquelle une si grande incorporation covalente est possible avec les dérivés BP, est que la formation de l'intermédiaire réactif, via l'irradiation aux UV, est un phénomène dynamique et répétitif. L'intermédiaire radicalaire hautement réactif produit lors de l'irradiation du Bpa peut revenir à son état initial non-activé et peut être réactivé de nouveau, par un autre photon. Bref, aussi longtemps que l'intermédiaire radicalaire n'aura pas réagi avec un résidu approprié, il regagnera son état original et maintiendra ainsi ses propriétés de ligand et de photoactivation. Ce schéma d'activation-inactivation est particulier à ce genre de groupements photosensibles. Par exemple, les groupements azido

ou diazométhyle empruntent une voie irréversible, une fois activés, en libérant une molécule d'azote gazeux. Les dérivés nitrène et carbène ainsi formés, hautement instables, doivent alors réagir immédiatement avec des résidus dans leurs voisinages immédiats. Quoique relativement efficaces, les rendements obtenus avec ces dérivés sont généralement inférieurs de 50% aux rendements obtenus avec les dérivés BP (ESCHER *et al.*, 1978; GUILLEMETTE & ESCHER, 1983). En cela, un dérivé azido de l'AngII, le AngII-N₃, connu pour marquer efficacement le récepteur AT₁ (GUILLEMETTE & ESCHER, 1983; GUILLEMETTE *et al.*, 1986) s'est avéré très peu efficace pour le marquage covalent du récepteur AT₂. Une explication simple à ce phénomène est que contrairement au récepteur AT₁, le groupement photosensible azido est trop éloigné des sites d'attaques potentiels dans le récepteur AT₂. D'autre part, de récentes études suggèrent que les groupements azido n'attaqueraient pas préférentiellement les liens C-H une fois activés (HAZUM, 1983). L'intermédiaire nitrène singulet, formé par irradiation du groupement azido, réagirait plutôt avec le noyau aromatique de son groupement phényl et provoquerait ainsi la formation d'un intermédiaire cétènimine (PLATZ, 1995). Cet intermédiaire pourrait être attaqué par des amines libres hautement nucléophiles comme celle de la chaîne latérale de la lysine. Le groupement sulfidryl du résidu cystéine pourrait aussi être assez nucléophile pour attaquer l'intermédiaire cétènimine, à condition bien sûr qu'il soit réduit. Cette théorie limite ainsi le nombre de sites potentiels d'incorporation covalente. De plus, les hauts rendements d'incorporation observés sur l'AT₁ pourraient également être expliqués par cette nouvelle théorie. Les études de modélisation et de mutagénèse dirigée suggèrent que la partie carboxyl du résidu phénylalanine 8 de la molécule d'AngII interagit avec l'amine latérale du résidu lysine 199 du récepteur AT₁ situé dans le cinquième domaine transmembranaire (NODA *et al.*, 1995; YAMANO *et al.*, 1995; HUNYADY *et al.*, 1996). Il est donc possible, selon cette théorie, que cette lysine soit le site d'ancrage covalent du AngII-N₃ au récepteur AT₁ (des études à ce sujet sont présentement en cours dans notre laboratoire). L'analyse par SDS-PAGE des complexes covalents, obtenus suite au

marquage du myomètre humain, n'a révélé qu'une seule bande radioactive correspondant à une protéine de masse moléculaire apparente (M_r) de 68 kDa. Ce marquage a été complètement aboli par l'ajout d'AngII ou de PD 123319, un analogue sélectif au récepteur AT₂. Ces résultats démontrent donc que le ¹²⁵I-AngII-Bpa⁸ marque très efficacement et spécifiquement le récepteur AT₂ dans les conditions utilisées. Fait intéressant, la M_r du récepteur AT₂ du myomètre humain est supérieure à celle du récepteur AT₁ du cortex surrénalien bovin (58 kDa). Quoique difficilement comparables vue la différence d'espèce et de tissus, ces résultats suggéraient à l'époque que d'importantes différences structurales pouvaient exister entre ces deux récepteurs.

Pendant l'exécution de ces travaux, des résultats conflictuels sont apparus dans la littérature concernant la taille du récepteur AT₂. En utilisant l'approche du marquage par réticulation à l'aide d'agents pontants, des M_r de 79 kDa et 100 kDa ont été estimées pour le récepteur AT₂ des cellules granulosa ovariennes de rat et d'une lignée de fibroblastes de souris (R3T3) (PUCELL *et al.*, 1991; DUDLEY *et al.*, 1991). Afin de déterminer si ces variations de M_r étaient reliées aux différentes approches ou à des différences structurales, nous avons marqué le récepteur AT₂ des cellules R3T3 et d'une lignée de phéochromocytomes de rat (PC-12). Nous avons ainsi déterminé des M_r respectives de 90 kDa et 140 kDa pour les récepteurs AT₂ de ces cellules. Ces résultats ont permis de conclure que le récepteur AT₂ présente des différences structurales selon l'espèce ou il est exprimé. De plus, la M_r du récepteur AT₂ des cellules PC-12 est différente de celle déterminée à partir des cellules granulosa ovariennes de rat où une valeur de 79 kDa a été estimée (PUCELL *et al.*, 1991). Cette observation suggèrent également que des différences structurales sont aussi présentes sur le récepteur AT₂ de différents tissus d'une même espèce. D'autre part, selon les résultats du deuxième manuscrit, il est évident que l'utilisation de la chromatographie d'exclusion n'est pas un moyen efficace pour détecter des différences structurales, comme celles observées au niveau de la N-glycosylation. Cette

mesure reflète en fait le volume hydraté de la protéine solubilisée. Cette protéine, en solution, est entourée d'une couche de détergent auquel une certaine quantité d'eau y est adsorbée. Il est probable que la présence ou le nombre de différentes chaînes d'oligosaccharide sur le récepteur AT₂ n'ait pas un effet significatif sur son volume d'hydratation ou que si effet il y a, on ne peut le détecter par cette technique. Le rayon de Stoke's, déterminé pour le récepteur AT₂ de ces différents tissus (66 Å) est cependant similaire à celui déterminé pour le récepteur de l'AngII du myomètre de chien par CAPPONI & CATT, 1980, qui doit vraisemblablement être le récepteur AT₂ vue la prédominance de ce type de récepteur dans le myomètre de toutes les espèces étudiées jusqu'à maintenant (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

Le patron de migration large et diffus du récepteur AT₂ sur gel SDS suggèrait qu'il s'agissait d'une glycoprotéine. En effet, les glycoprotéines migrent anormalement sur un gel à cause de leur mauvaise interaction avec le SDS (KLOTZ & LOHSE, 1986; GRIGORIADIS *et al.*, 1988). Afin de vérifier si le récepteur AT₂ est effectivement une glycoprotéine, nous avons soumis les complexes marqués à la digestion par la glycopeptidase-F (PNGase-F), une endoglycosidase qui hydrolyse le lien entre l'asparagine et le premier résidu N-acétylglucosamine sur une chaîne d'oligosaccharides N-liés (TARENTINO *et al.*, 1985), et à des chromatographies d'affinité sur différentes lectines. L'adsorption du récepteur AT₂ sur une lectine de germe de blé et la sensibilité accrue du récepteur AT₂ à l'effet de la PNGase-F ont clairement démontré la nature glycoprotéique de cette protéine. La déglycosylation du récepteur AT₂ du myomètre humain et des cellules R3T3 et PC-12 a diminué la taille de ces derniers jusqu'à une valeur identique de 31 kDa. Dans une autre étude, une M_r similaire de 33 kDa a été estimée suite à la déglycosylation du récepteur AT₂ du myomètre humain (LAZARD *et al.*, 1994). Ces résultats suggéraient donc que le récepteur AT₂ est une protéine de ~32 kDa et que les variations de taille moléculaire observées dans différents tissus sont dues essentiellement à

des degrés différents de N-glycosylation. Ces observations ont été confirmées par le clonage du récepteur AT₂ chez le rat (KAMBAYASHI *et al.*, 1993; MUKOYAMA *et al.*, 1993), la souris (NAKAJIMA *et al.*, 1993) et l'homme (TSUZUKI *et al.*, 1994). La séquence du récepteur AT₂ de ces espèces révèle une protéine de 363 acides aminés avec une homologie de séquence supérieure à 93%. Les M_r obtenues suite à la déglycosylation du récepteur AT₂ sont toutefois inférieures à la taille de 41 kDa déduite à partir de la séquence primaire de ce dernier. Ces M_r sont obtenues suite à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Il est assumé, dans cette technique, que les protéines lient en général une molécule de SDS par deux acides aminés et qu'elles adoptent la même conformation une fois dénaturées (JORGENSEN, 1982). Ces hypothèses sont incertaines dans le cas des protéines qui contiennent un nombre important d'acides aminés hydrophobes comme les récepteurs à 7DTM. Il est probable, qu'en solution, ces protéines adoptent une conformation plus compacte les faisant migrer relativement rapidement dans une matrice poreuse. Des phénomènes similaires ont été observés pour le récepteur AT₁ de l'AngII et le récepteur D₂ de la dopamine (CARSON *et al.*, 1987; DAVID *et al.*, 1993).

Les études de déglycosylation du récepteur AT₂ du myomètre humain et l'effet d'un traitement à la tunicamycine sur la N-glycosylation du récepteur AT₂ des cellules PC-12 suggère la présence d'au moins trois chaînes d'oligosaccharide sur ce récepteur. La séquence du récepteur AT₂ contient, en amino-terminal, cinq sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) qui sont conservés chez toutes les espèces étudiées jusqu'à maintenant (KAMBAYASHI *et al.*, 1993; MUKOYAMA *et al.*, 1993; NAKAJIMA *et al.*, 1993; TSUZUKI *et al.*, 1994). Les différents degrés de N-glycosylation du récepteur AT₂ ne peuvent donc pas être reliés au nombre de sites potentiels d'ancrage des chaînes d'oligosaccharides. Nous pensons plutôt que cette variabilité est reliée à des degrés différents d'occupation des sites potentiels de N-glycosylation ou à l'occupation de ces sites par différentes chaînes d'oligosaccharides. Il a été démontré que le processus de N-

glycosylation est dépendant d'au moins deux facteurs (GOOCHEE *et al.*, 1992). Premièrement, ce processus est dépendant du type cellulaire. Cette influence est attribuable principalement à la présence, aux cinétiques et à la localisation des différentes glycosyltransférases et glycosidases nécessaires au processus. Ces caractéristiques ont un effet direct sur le type d'élongation de chaîne d'oligosaccharides qui se fait dans l'appareil de Golgi. Les types de N-glycans sont nombreux et peuvent être composés soit de chaînes riches en mannose, complexes ou hybrides pouvant avoir chacune un nombre différent de monosaccharides (KORNFELD & KORNFELD, 1985). Il est possible que ces paramètres varient grandement entre les cellules humaines, murines ou de rat. Deuxièmement, la protéine elle-même exerce une influence considérable sur son propre processus de N-glycosylation. Sa conformation peut affecter directement ce processus en favorisant ou en diminuant l'accès des glycosyltransférases et glycosidases à leurs sites d'action. Dans le même sens, cette conformation peut aussi affecter l'accessibilité des monosaccharides à leurs sites d'ancrage. De plus, l'élongation d'une chaîne d'oligosaccharide voisine peut affecter le processus de glycosylation à un autre site. Ces effets pourraient expliquer en partie les différents degrés de glycosylation observés chez le récepteur AT₂ puisque les segments amino-terminaux des récepteurs murins et de rat, où sont situés les sites potentiels de N-glycosylation, n'ont seulement que 59% d'homologie de séquence en acides aminés avec la protéine humaine (KAMBAYASHI *et al.*, 1993; NAKAJIMA *et al.*, 1993; TSUZUKI *et al.*, 1994).

La présence de séquences consensus de N-glycosylation sur plusieurs récepteurs à 7DTM suggère que cette modification post-traductionnelle pourrait avoir des rôles importants. La N-glycosylation peut influencer, *in vitro*, quelques propriétés physicochimiques et biochimiques d'une protéine dont sa solubilité, la résistance à la dénaturation thermique et la résistance à la dégradation protéolytique (GOOCHEE *et al.*, 1992). La N-glycosylation peut aussi être impliquée directement dans les processus de

maturation d'une protéine lors de l'adoption de sa structure tertiaire, de l'assemblage de ses sous-unités, de son transport, de son ciblage ou de sa sécrétion (GOOCHEE *et al.*, 1992). Afin de définir les rôles de la N-glycosylation du récepteur AT₂, nous avons utilisé un bloqueur métabolique de la N-glycosylation, la tunicamycine. Cet antibiotique inhibe la synthèse du corps principal des polysaccharides qui se fait d'abord sur le dolichol, un lipide du réticulum endoplasmique et qui est ensuite transféré sur les protéines pendant le processus de traduction (ELBEIN, 1984). En bloquant ainsi la formation de l'intermédiaire lipidique, la N-glycosylation des protéines ne peut avoir lieu. Suite au traitement à la tunicamycine, l'observation de populations de récepteur AT₂ partiellement glycosylés et totalement déglycosylés à la surface des cellules PC-12, montre clairement que la N-glycosylation n'est pas essentielle au transport du récepteur AT₂ à la membrane plasmique. Cependant, bien que les populations partiellement glycosylées s'accumulent rapidement et abondamment à la surface des cellules, la population totalement déglycosylée s'accumule beaucoup plus lentement pendant le traitement. Nous postulons que ce phénomène est le résultat d'un changement subtil des cinétiques de transport du récepteur AT₂ déglycosylé vers la membrane plasmique et/ou d'une diminution de sa stabilité. Malheureusement, les effets toxiques de la tunicamycine, observées suite à un traitement prolongé des cellules, nous ont empêchés de vérifier cette hypothèse. Les études de liaison montrent une baisse apparente d'affinité d'un facteur 2 suite à la déglycosylation partielle du récepteur AT₂. Il est probable que cette valeur ne reflète pas l'effet réel de la N-glycosylation sur les propriétés de liaison du récepteur AT₂. En effet, pour chaque protocole utilisé, une quantité non-négligeable de récepteur AT₂ natif était présent à travers les populations de récepteurs partiellement déglycosylés. De plus, des populations de récepteurs AT₂ glycosylés à différents degrés étaient également présentes dans la plupart des expériences. La baisse d'affinité d'un facteur 2 n'est peut-être en fait qu'une valeur moyenne de plusieurs valeurs d'affinité significativement inférieures à celle du récepteur natif. Afin de déterminer l'effet réel de la N-glycosylation sur la liaison, il serait nécessaire de muter systématiquement un à

un les sites potentiels de N-glycosylation, et de vérifier l'impact de ces mutations sur la structure et l'affinité du récepteur AT₂. Il est probable que l'effet observé sur l'affinité soit le résultat d'une altération de la conformation active du récepteur AT₂ suite à sa déglycosylation. Une autre possibilité est que les chaînes d'oligosaccharides participent directement au domaine de liaison de l'hormone.

La N-glycosylation est directement impliquée dans le processus de maturation, dans le transport et dans l'adoption des conformations actives des récepteurs de l'insuline (RONNETT & LANE, 1981; RONNETT *et al.*, 1984; COLLIER *et al.*, 1993), et de l'EGF (MANGELSDORF SODERQUIST & CARPENTER, 1984; SLIEKER & LANE, 1985; SLIEKER *et al.*, 1986). L'inhibition de la N-glycosylation semble aussi altérer les mécanismes de transport du récepteur nicotinique (MERLIE & SMITH, 1986) et de quelques membres de la famille des récepteurs à 7DTM incluant le récepteur du VIP (EL BATTARI *et al.*, 1991), β -adrénergique (CERVANTES-OLIVIER *et al.*, 1988; RANDS *et al.*, 1990) et le récepteur du PAF (GARCÍA RODRÍGUEZ *et al.*, 1995). Dans certains de ces cas il a été démontré que les protéines non-glycosylées restaient emprisonnées dans le réticulum endoplasmique ou que le temps de transition des protéines de cet organel vers l'appareil de Golgi était significativement augmenté. Par contre la N-glycosylation n'influence pas le transport du récepteur AT₁ de l'AngII (YAMANO *et al.*, 1992) et du récepteur m2 muscarinique (VAN KOPPEN & NATHANSON, 1990). À la lumière de ces données il est clair que l'impact de la N-glycosylation, sur les destinées et fonctions des récepteurs, varie beaucoup et il n'est pas possible de prédire ou de définir les rôles exacts de cette modification post-traductionnelle sur une protéine en particulier. Selon PAREKH (1991), les effets de la glycosylation ne peuvent être généralisés. Ils doivent plutôt être compris et intégrés individuellement pour chaque protéine étudiée. En fonction des connaissances actuelles, il est légitime de penser que plusieurs rôles de la N-glycosylation résident dans les changements de conformation qu'elle impose aux protéines (KEUTMANN

et al., 1985; GOOCHEE *et al.*, 1992) et que ces changements ont des impacts plus ou moins importants sur les propriétés de différentes protéines. De plus, les propriétés qui sont susceptibles d'être influencées par la glycosylation, ne sont pas nécessairement toutes identifiées. Existe-t-il des mécanismes de ciblage, dépendant de la glycosylation, permettant le transport d'un récepteur à un endroit particulier sur la membrane plasmique (par exemple dans le cas des cellules polarisées)? La glycosylation influence-t-elle la stabilité des récepteurs *in vivo*? La glycosylation influence-t-elle le transit intracellulaire des récepteurs, que ce soit lors de leur synthèse ou lors des mécanismes de recyclage suivant l'internalisation? Les réponses à ces questions et la découverte de nouvelles propriétés biochimiques de ces protéines permettront vraisemblablement d'identifier d'autres rôles de la N-glycosylation.

La liste des ligands détectés par les récepteurs à 7DTM ne cesse de croître. La très grande diversité de ces ligands, au niveau structural, suggère qu'ils utilisent différents mécanismes pour interagir avec leurs récepteurs. Un effort considérable a été fourni pour identifier les domaines de liaison des récepteurs à 7DTM. La majeure partie de ce travail a été effectué sur les membres de la famille des récepteurs adrénergiques. Il a été démontré que le domaine de liaison des ligands adrénergiques (< 0.2 kDa) est situé entre les hélices transmembranaires dans le tiers extérieur de la membrane plasmique (OSTROWSKI *et al.*, 1992; STRADER *et al.*, 1994). Ce mode de liaison est aussi utilisé par d'autres bioamines telles l'acétylcholine, l'histamine et la sérotonine (DOHLMAN *et al.*, 1992; SAVARESE & FRASER, 1992; PROBST *et al.*, 1992). Des domaines de liaison ont aussi été identifiés pour des ligands plus volumineux (> 10 kDa) comme la TSH, la FSH et la LH qui interagissent avec la très longue extension amino-terminale extracellulaire de leur récepteurs respectifs (BOCKAERT, 1991; MOYLE *et al.*, 1991; NAGAYAMA *et al.*, 1991). Les domaines de liaison des ligands de taille intermédiaire (0.5 kDa à 5 kDa) sont moins bien caractérisés. Des études récentes suggèrent cependant que ces hormones interagissent à la

fois avec les domaines extracellulaires et les hélices transmembranaires de leurs récepteurs (HUANG *et al.*, 1994a; HUANG *et al.*, 1994b; NODA *et al.*, 1995; FENG *et al.*, 1995; MONNOT *et al.*, 1996).

La plupart des domaines de liaison des récepteurs à 7DTM ont été identifiés en mutant systématiquement plusieurs de leurs acides aminés. Cependant cette approche permet également l'identification de domaines fonctionnels qui ne sont pas nécessairement à proximité du domaine d'interaction, les mutations peuvent en effet affecter indirectement les propriétés de liaison et d'activation des récepteurs en altérant leur conformation. De plus, dans la majorité des cas, l'utilisation de cette approche ne permet pas d'identifier directement la partie du ligand interagissant avec le domaine de liaison identifié. La technique du marquage par photoaffinité est une méthode plus directe pour cartographier les domaines de liaison puisqu'elle révèle les régions du récepteur qui se trouvent à proximité du ligand photosensible suite à sa liaison. Elle permet en plus de définir les régions de contact entre le ligand photosensible et son récepteur.

Afin d'identifier les domaines de liaison du récepteur AT₂, nous avons utilisé deux analogues photosensibles qui réagissent covalamment via l'une ou l'autre des extrémités de l'hormone. Suite au marquage par photoaffinité du récepteur AT₂, les complexes hormone-récepteur ont été soumis à différentes digestions enzymatiques ou chimiques. Nous avons identifié les fragments obtenus en comparant leur M_r à celles déduites à partir de la séquence du récepteur. Le récepteur AT₂ est glycosylé exclusivement sur sa queue amino-terminale extracellulaire (KAMBAYASHI *et al.*, 1993; MUKOYAMA *et al.*, 1993). Cette caractéristique a permis l'identification rapide du domaine d'incorporation du ¹²⁵I-AngII-Bpa¹ puisque les fragments obtenus étaient glycosylés. Avec l'utilisation de deux endoprotéinases nous avons été en mesure de conclure que ce domaine d'incorporation se situe entre les résidus 3-30 de la queue amino-terminale du récepteur AT₂. D'autre part, à

l'aide de l'hydrolyse au bromure de cyanogène (CNBr) des complexes hormone-récepteur, nous avons déterminé que le site d'incorporation du ^{125}I -AngII-Bpa⁸ se situe dans le troisième domaine transmembranaire du récepteur AT₂. L'utilisation d'un récepteur AT₂ mutant, déficient en un site de clivage par le CNBr, a permis de circonscrire ce site d'incorporation aux résidus 129-138 du récepteur. Ces résultats suggèrent que, lors de la liaison, l'extrémité amino-terminale de l'AngII se situe à proximité de la queue extracellulaire du récepteur AT₂ et que l'extrémité carboxyl-terminale de la molécule se situe dans la membrane plasmique entre les hélices du récepteur et à proximité du troisième domaine transmembranaire.

Cette interprétation des résultats sous-entend que les analogues photosensibles utilisés dans cette étude sont des agonistes. Il est tentant de proposer que les modes d'interaction de ces molécules sont fortement similaires à ceux utilisés par l'AngII (vue leur fortes affinités) cependant nous ne pouvons en être certains pour le moment. Aucune activité cellulaire ou tissulaire, médiée par l'AT₂, n'est présentement acceptée par la communauté scientifique de façon définitive. Le classement des ligands reconnus par le récepteur AT₂ en agonistes ou antagonistes est donc pour le moment très discutable. En égard à cette réalité il devient donc important de nuancer l'interprétation des résultats, telle que décrite dans le quatrième manuscrit, en précisant que les domaines identifiés ne sont pas nécessairement les domaines de liaison de l'agoniste mais bien des domaines d'interaction peptidique du récepteur AT₂. Néanmoins, cette étude montre des évidences directes suggérant qu'un ligand peptidique, de taille intermédiaire, peut interagir à la fois avec les domaines extracellulaires et transmembranaires d'un récepteur à 7DTM. Ces résultats et d'autres études récentes proposent que ce schéma d'interaction est peut être commun à une gamme de récepteurs de cette famille. Il a été démontré que des résidus chargés, situés dans les deuxième et troisième boucles extracellulaires du récepteur AT₁, interagissent spécifiquement avec la partie amino-terminale de l'AngII au niveau des résidus

aspartate et arginine (FENG *et al.*, 1995; Hunyady *et al.*, 1996). D'autre part, il est proposé que lors de la liaison au récepteur AT₁, la partie carboxyl-terminale de l'AngII se situe dans la membrane plasmique entre les domaines transmembranaires III, V, VI et VII (YAMANO *et al.*, 1995; HUNYADY *et al.*, 1996). Pareillement, les domaines de liaison de la substance-P ont été identifiés dans les première et deuxième boucles extracellulaires, le segment amino-terminal et les domaines transmembranaires II et VII du récepteur NK-1 (HUANG *et al.*, 1994a; HUANG *et al.*, 1994b; LI *et al.*, 1995). Les résultats soulèvent un autre point intéressant, l'interaction simultanée d'un ligand de huit acides aminés avec l'extension amino-terminale et la moitié cytoplasmique d'un domaine transmembranaire suggère qu'il doit y avoir un rapprochement entre ces deux parties du récepteur. Chez plusieurs membres de la famille des récepteurs à 7DTM, dont le récepteur AT₁ et NK-1 (YAMANO *et al.*, 1992; OHYAMA *et al.*, 1995; BOYD *et al.*, 1996), la présence d'un pont disulfure entre les résidus cystéines de l'extension amino-terminale et de la troisième boucle extracellulaire a été démontré. La présence de résidus cystéines à ces positions dans la récepteur AT₂ suggère fortement qu'un tel pont existe entre ces deux régions et qu'il pourrait ainsi contribuer à rapprocher l'extension amino-terminale de la surface cellulaire.

De part leur nature, les résultats nous portent cependant à spéculer sur l'aspect fonctionnel d'un tel mode d'interaction. Quelques évidences indirectes suggèrent en effet qu'une interaction de la partie carboxyl-terminale de l'AngII avec les domaines transmembranaires du récepteur AT₂ aurait possiblement des conséquences physiologiques importantes. D'abord, les propriétés agonistes de la molécule sont conférées par sa partie carboxyl-terminale (REGOLI *et al.*, 1974). D'autre part, il a été démontré que certains résidus, retrouvés dans les domaines transmembranaires du récepteur AT₁ sont essentiels à l'activation (BIHOREAU *et al.*, 1993; MARIE *et al.*, 1994; MONNOT *et al.*, 1995). De façon générale, il semble que l'activation des récepteurs à 7DTM par leurs domaines transmembranaires est la règle plutôt que l'exception. Cependant la façon dont les ligands

communiquent avec ces domaines peut varier significativement. Tel que déjà mentionné, les bioamines interagissent exclusivement avec les domaines transmembranaires de leurs récepteurs. Dans ce cas particulier, le site d'interaction du ligand constitue essentiellement le site d'activation du récepteur, vu la petite taille de ce dernier (STRADER *et al.*, 1994). Le récepteur du glutamate et le récepteur sensible au calcium utilisent, pour détecter ces petites molécules, un mécanisme qui est totalement différent de celui emprunté par les récepteurs des bioamines. Le domaine de liaison de ces récepteurs est situé dans leur long segment amino-terminal extracellulaire. Il est suggéré que suite à la liaison, ce segment change de conformation et devient lui-même un ligand en interagissant avec les domaines transmembranaires du récepteur (TANABE *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1993; O'HARA *et al.*, 1993; CONKLIN & BOURNE, 1994; COUGHLIN, 1994). Chez les récepteurs aux glycoprotéines comme le récepteur de la LH, les longs segments amino-terminaux extracellulaires fournissent la majeure partie de l'énergie de liaison. Cependant il est suggéré que la région d'activation de ces récepteurs, par leurs ligands, se trouve dans les domaines transmembranaires (JI & JI, 1991). Par analogie avec ce type d'interaction, il est possible que l'interaction entre la partie amino-terminale de l'AngII et l'ectodomaine du récepteur AT₂ aurait pour but de stabiliser le complexe hormone-récepteur.

A l'aide de la méthode de marquage par photoaffinité, nous avons identifiés deux domaines de liaison peptidique du récepteur AT₂. Les résultats suggèrent que les peptides interagissent à la fois avec les domaines extracellulaire et transmembranaires du récepteur AT₂ via leurs parties amino- et carboxyl-terminales respectivement. Ce schéma d'interaction est possiblement emprunté par plusieurs récepteurs à 7DTM pour reconnaître leurs ligands.

CONCLUSION

L'objectif principal du présent travail était de caractériser les propriétés biochimiques et structurales du récepteur AT₂.

Nous avons démontré que l'analogue photosensible ¹²⁵I-AngII-Bpa⁸ est un ligand très efficace pour le marquage covalent du récepteur AT₂. Des rendements très élevés de l'ordre de 70% d'incorporation ont été obtenus avec ce peptide.

A l'aide du ¹²⁵I-AngII-Bpa⁸ nous avons marqué spécifiquement le récepteur AT₂ humain. Nous avons estimé sa taille moléculaire apparente, par SDS-PAGE, à 68 kDa. Par la même méthode nous avons marqué le récepteur AT₁ de rat et les récepteurs AT₂ de souris et de rat et avons déterminé des tailles moléculaires apparentes respectives de 58 kDa, 90 kDa et 140 kDa respectivement.

La nature glycoprotéique du récepteur AT₂ a été démontrée par la sensibilité marquée des complexes covalents à un traitement à l'endoglycosidase, par l'adsorption de ces complexes sur une lectine et par l'effet d'un bloqueur métabolique de la N-glycosylation sur la taille apparente du récepteur AT₂. Ces études ont permis de conclure que le récepteur AT₂ est N-glycosylé sur au moins trois sites et que ces chaînes d'oligosaccharides sont de type complexe. Nous avons en plus démontré que la grande variabilité des tailles apparentes du récepteur AT₂ est causée essentiellement par des degrés différents de N-glycosylation. La taille apparente du récepteur AT₂ déglycosylé *in vivo* ou *in vitro* (~32 kDa) est substantiellement inférieure à celle déduite à partir de sa séquence (41 kDa). Ce phénomène, qui est aussi observé pour d'autres récepteurs à 7DTM, est relié au comportement anormal du récepteur lors des analyses par SDS-PAGE.

Par l'utilisation d'un bloqueur métabolique de la N-glycosylation, la tunicamycine, nous avons démontré que, contrairement à d'autres récepteurs de la même famille, la N-glycosylation du récepteur AT₂ n'est pas nécessaire à son transport vers la membrane plasmique. Bien qu'il semble à première vue que cette modification du récepteur ne soit pas importante pour ses propriétés de liaison, la question reste encore sans réponse définitive. L'utilisation de la mutagenèse dirigée pour muter systématiquement les sites potentiels de N-glycosylation nous permettrait d'obtenir d'une façon exclusive, des populations de récepteur AT₂ glycosylées à différents degrés ou totalement déglycosylées. Cette approche nous permettrait ainsi de faire une analyse propre à chaque population de récepteur. La N-glycosylation du récepteur AT₂ pourrait avoir également d'autres effets. Parmi les hypothèses intéressantes à vérifier, elle pourrait influencer le transit intracellulaire du récepteur, sa stabilité *in vitro* ou *in vivo* et son activation.

Finalement, à l'aide du ¹²⁵I-AngII-Bpa⁸ et d'un autre analogue photosensible, le ¹²⁵I-AngII-Bpa¹, nous avons identifié deux domaines de liaison au niveau du récepteur AT₂. Les résultats suggèrent que l'AngII interagit avec la partie extracellulaire amino-terminale et le troisième domaine transmembranaire du récepteur AT₂ via ses extrémités amino-terminale et carboxyl-terminale respectivement. Ces résultats appuient l'hypothèse voulant que les ligands de petites tailles reconnaissent leurs récepteurs en interagissant avec l'ectodomaine et les parties transmembranaires de ces derniers. Il sera intéressant de vérifier si les domaines de liaison identifiés contiennent des résidus essentiels aux propriétés d'activation du récepteur AT₂.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement les Drs. Gaétan Guillemette et Emanuel Escher, mes directeurs de thèse. Leur disponibilité, leurs judicieux conseils, leurs encouragements et leur grande confiance m'ont permis de mener ce travail à terme dans une atmosphère d'enthousiasme, de motivation et d'apprentissage. Je les remercie aussi pour m'avoir confié ce projet fort intéressant et pour la grande latitude qu'ils m'ont laissée à l'égard des orientations de ce projet.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement mes collègues et amis Sylvie Bernier, Sandie Briand, Marc Poitras, Louise Chrétien, Darren Richard, Stéphane Laporte, Stéphane Poirier, Aichata Sidibe et Stéphanie Roy. L'esprit de camaraderie et de collaboration, leurs conseils et leurs encouragements furent grandement appréciés.

Je remercie également le Dr. Alain Fournier de l'INRS-Santé, le Dr. Patricia Provencher du Service d'endocrinologie de la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke et le Dr. Michel Bouvier du Département de biochimie de l'Université de Montréal pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Finalement, je tiens à remercier les membres du Département de pharmacologie, étudiants, professeurs et personnel administratif qui, de près ou de loin, ont participé à ma formation et à la réussite de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

AKIYAMA, S.K., YAMADA, S.S. & YAMADA, K.M. (1989) Analysis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor. *J. Biol. Chem.* **264**: 18011-18018

ARAKAKI, R.F., HEDO, J.A., COLLIER, E. & GORDEN, P. (1987) Effects of castanospermine and 1-deoxynojirimycin on insulin receptor biogenesis. *J. Biol. Chem.* **262**: 11886-11892

ATIENZA-SAMOLS, S.B., RAZON PINE, P. & SHERMAN, M.I. (1980) Effects of tunicamycin upon glycoprotein synthesis and development of early mouse embryos. *Dev. Biol.* **79**: 19-32

BAKER, K.M. & ACETO, J.F. (1990) Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am. J. Physiol.* **259**: H610-H618

BALDWIN, J.M. (1993) The probable arrangement of the helices in G-protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**: 1693-1697

BALLA, T., BAUKAL, A.J., ENG, S. & CATT, K.J. (1991) Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol. Pharmacol.* **40**: 401-406

BATES, M.D., GINGRICH, J.A., BUNZOW, J.R., FALARDEAU, P., DEARRY, A., SENOGLES, S.E., CIVELLI, O. & CARON, M.G. (1990) Molecular characterization of dopamine receptors. *Am. J. Hypertension.* **3**: S29-S33

- BEFORT, K., TABBARA, L., BAUSCH, S., CHAVKIN, C., EVANS, C. & KIEFFER, B. (1996) The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the delta-opioid receptor is not the anionic counterpart for cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site. *Mol. Pharmacol.* **49**: 216-223
- BERNIER, S.G., FOURNIER, A. & GUILLEMETTE, G. (1994) A specific binding site recognizing a fragment of angiotensin II in bovine adrenal cortex membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **271**: 55-63
- BERNIER, S.G., SERVANT, G., BOUDREAU, M., FOURNIER, A. & GUILLEMETTE, G. (1995) Characterization of a binding site for angiotensin IV on bovine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **291**: 191-200
- BERRIDGE, M.J. & IRVINE, R.F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature (London)* **312**: 315-321
- BERRIDGE, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 159-193
- BHAT, G.J., THEKKUMKARA, T.J., THOMAS, W.G., CONRAD, K.M. & BAKER, K.M. (1994) Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 31443-31449

- BIHOREAU, C., MONNOT, C., DAVIES, E., TEUTSCH, B., BERNSTEIN, K.E., CORVOL, P. & CLAUSER, E. (1993) Mutation of Asp 74 of the rat angiotensin receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes G-protein coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 5133-5137
- BOCKAERT, J. (1991) G-protein-coupled receptors: structure, function and interaction. *Curr. Opinion Neurobiol.* **1**: 32-42
- BOEGE, F., WARD, M., JURSS, R., HEKMAN, M. & HELMREICH, E.J.M. (1988) Role of glycosylation for β 2-adrenoceptor function in A431 cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 9040-9049
- BOTTARI, S.P., TAYLOR, V., KING, I.N., BOGDAL, Y., WHITEBREAD, S. & DE GASPARO, M. (1991) Angiotensin II AT₂ receptor does not interact with guanine nucleotide binding proteins. *Eur. J. Pharmacol.* **207**: 157-163
- BOTTARI, S.P., KING, I.N., REICHLIN, S., DAHLSTROEM, I., LYDON, N. & DE GASPARO, M. (1992) The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**: 206-211
- BOULAY, G., SERVANT, G., LUONG, T.-T., ESCHER, E. & GUILLEMETTE, G. (1992) Modulation of angiotensin II binding affinity by allosteric interaction of polyvinyl sulfate with an intracellular domain of the DuP 753-sensitive angiotensin receptor of bovine adrenal glomerulosa. *Mol. Pharmacol.* **41**: 809-815

- BOUVIER, M., MOFFETT, S., LOISEL, T.P., MOUILLAC, B., HEBERT, T. & CHIDIAC, P. (1995) Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. *Biochem. Soc. Transactions* **23**: 116-120
- BOYD, N.D., KAGE, R., DUMAS, J.J., KRAUSE, J.E. & LEEMAN, S.E. (1996) The peptide binding site of the substance P (NK-1) receptor localized by a photoreactive analogue of substance P: presence of a disulfide bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 433-437
- BRAUN-MENENDEZ, E., FASCILOLO, J.C., LELOIR, L.F. & MUNOZ, J.M. (1940) The substance causing renal hypertension. *J. Physiol. (London)* **98**: 283-298
- BROWN, E.M., GAMBA, G., RICCARDI, D., LOMBARDI, M., BUTTERS, R., KIFOR, O., SUN, A., HEDIGER, M.A., LYTTON, J. & HEBERG, S.C. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature (London)* **366**: 575-580
- BUISSON, B., BOTTARI, S.P., DE GASPARO, M., GALLO-PAYET, N. & PAYET, M.D. (1992) The angiotensin AT_2 receptor modulates T-type calcium current in non-differentiated NG 108-15 cells. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **309**: 161-164
- BUISSON, B., LAFLAMME, L., BOTTARI, S.P., DE GASPARO, M., GALLO-PAYET, N. & PAYET, M.D. (1995) A G protein is involved in the angiotensin AT_2 receptor inhibition of the T-type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 1670-1674

- CAPPONI, A.M. & CATT, K.J. (1980) Solubilization and characterization of adrenal and uterine angiotensin II receptors after photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* **255**: 12081-12086
- CARSON, M.C., LEACH HARPER, C.M., BAUKAL, A.J., AGUILERA, G. & CATT, K.J. (1987) Physicochemical characterization of photoaffinity-labeled angiotensin II receptors. *Mol. Endocrinol.* **1**: 147-153
- CARVER, J.P. & CUMMING, D.A. (1987) Virtual and solution conformation of oligosaccharides. *Pure & Appl. Chem.* **59**: 1465-1476
- CASCIERI, M.A., FONG, T.M. & STRADER, C.D. (1995) Molecular characterization of a common binding site for small molecules within the transmembrane domain of G-protein coupled receptors. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **33**: 179-185
- CATT, K.J., SANDBERG, K. & BALLA, T. Angiotensin II receptor and signal transduction mechanisms. Dans M. K. Raizada, M.I. Phillips & C. Sumners (Eds): *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*. Boca Raton: CRC Press, Inc. (1993) p. 307-356
- CERVANTES-OLIVIER, P., DELAVIER-KLUTCHKO, C., DURIEU-TRAUTMANN, O., KAVERI, S., DESMANDRIL, M. & STROSBERG, A.D. (1988) The β_2 -adrenergic receptors of human epidermoid carcinoma cells bear two different types of oligosaccharides which influence expression on the cell surface. *Biochem. J.* **250**: 133-143

- CHANG, R.S.L., LOTTI, V.J., CHEN, T.B. & FAUST, K.A. (1990) Two angiotensin II binding sites in rat brain revealed using [125 I] Sar¹, Ile⁸-angiotensin II and selective nonpeptide antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**: 813-817
- CHASSAGNE, C., BEATTY, B.G. & MELOCHE, S. (1995) Assignment of the human angiotensin II type 2 receptor gene (AGTR2) to chromosome Xq22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **25**: 601-603
- CHASSAGNE, C., SERVANT, M.J. & MELOCHE, S. (1996) Récepteurs de l'angiotensine II: rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de signalisation. *Médecine Science* Sous presse (*Médecine Science*)
- CHIDIAC, P., HEBERT, T.E., VALIQUETTE, M., DENNIS, M. & BOUVIER, M. (1994) Inverse agonist activity of β -adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45**: 490-499
- CHINI, B., MOUILLAC, B., ALA, Y., BALESTRE, M.-N., TRUMPP-KALLMEYER, S., HOFLACK, J., ELANDS, J., HIBERT, M., MANNING, M., JARD, S. & BARBERIS, C. (1995) Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V_{1a} vasopressin receptor. *EMBO J.* **14**: 2176-2182
- CHIU, A.T., HERBLIN, W.F., MC CALL, D.E., ARDECKY, R.J., CARINI, D.J., DUNCIA, J.V., PEASE, L.J., WONG, P.C., WEXLER, R.R., JOHNSON, A.L. & TIMMERMAN, P.B.M.W.M. (1989) Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**: 196-203

- CLAGETT-DAME, M. & MCKELVY, J.F. (1989) N-linked oligosaccharides are responsible for rat striatal dopamine D₂ receptor heterogeneity. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 145-154
- CLAPHAM, D.E. & NEER, E.J. (1993) New roles for G-protein beta-gamma dimers in transmembrane signalling. *Nature (London)* **365**: 403-406
- COLLIER, E., CARPENTIER, J.-L., BEITZ, L., CARO, L.H.P., TAYLOR, S.I. & GORDEN, P. (1993) Specific glycosylation site mutations of the insulin receptor alpha subunit impair intracellular transport. *Biochemistry* **32**: 7818-7823
- CONKLIN, B.R. & BOURNE, H.R. (1993) Structural elements of G α subunits that interact with G β -gamma, receptors, and effectors. *Cell*. **73**: 631-641
- CONKLIN, B.R. & BOURNE, H.R. (1994) Serpentine receptors and flytraps. *Nature (London)* **367**: 22
- COUGHLIN, S.R. (1994) Expanding horizons for receptors coupled to G proteins: diversity and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 191-197
- CRANE, J.K., CAMPANILE, C.P. & GARRISON, J.C. (1982) The hepatic angiotensin II receptor. II. Effect of guanine nucleotides and interaction with cyclic AMP production. *J. Biol. Chem.* **257**: 4959-4965
- CURNOW, K.M., PASCOE, L. & WHITE, P.C. (1992) Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1113-1118

- DARIMONT, C., VASSAUX, G., AILHAUD, G. & NEGREL, R. (1994) Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology* **135**: 2030-2036
- DAVID, C., FISHBURN, C.S., MONSMA, F.J., SIBLEY, D.R. & FUCHS, S. (1993) Synthesis and processing of D₂ dopamine receptors. *Biochemistry* **32**: 8179-8183
- DAVIS, D., LIU, X. & SEGALOFF, D.L. (1995) Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol. Endocrinol.* **9**: 159-170
- DE GASPARO, M., WHITEBREAD, S., MELE, M., MOTANI, A.S., WHITECOMBE, P.J., RAMJOUÉ, H.P. & KAMBER, B. (1990) Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**: S31-S35
- DE GASPARO, M., HUSAIN, A., ALEXANDER, W., CATT, K.J., CHIU, A.T., DREW, M., GOODFRIEND, T., HARDING, J.W., INAGAMI, T. & TIMMERMANS, P.B.M.W.M. (1994) Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* **25**: 924-927
- DOHLMAN, H.G., THORNER, J., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. (1992) Model system for the study of seven transmembrane segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 651-688

- DONNELLY, D., JOHNSON, M.S., BLUNDELL, T.L. & SAUNDERS, J. (1989) An analysis of the periodicity of conserved residues in sequenced alignments of G-protein coupled receptors. Implication for the three-dimensional structure. *FEBS Lett.* **251**: 109-116
- DORMÁN, G. & PRESTWICH, G.D. (1994) Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* **33**: 5661-5673
- DOUGLAS, J.G., ROMERO, M. & HOPFER, U. (1990) Signaling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium. *Kidney Int. Suppl.* **30**: S43-S47
- DUDLEY, D.T., PANEK, R.L., MAJOR, T.C., LU, G.H., BRUNS, R.F., KLINKEFUS, B.A., HODGES, J.C. & WEISHAAR, R.E. (1990) Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol. Pharmacol.* **38**: 370-377
- DUDLEY, D.T., HUBBELL, S.E. & SUMMERFELT, R.M. (1991) Characterization of angiotensin II (AT₂) binding sites in R3T3 cells. *Mol. Pharmacol.* **40**: 360-367
- DUKSIN, D. & MAHONEY, W.C. (1982) Relationship of the structure and biological activity of the natural homologs of tunicamycin. *J. Biol. Chem.* **257**: 3105-3109
- DUKSIN, D., SEIBERG, M. & MAHONEY, W.C. (1982) Inhibition of protein glycosylation and selective cytotoxicity toward virally transformed fibroblasts caused by B₃-tunicamycin. *Eur. J. Biochem.* **129**: 77-80

- EARP, H.S., HUCKLE, W.R., DAWSON, T.L., LI, X., GRAVES, L.M. & DY, R. (1995) Angiotensin II activates at least two tyrosine kinases in rat liver epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 28440-28447
- EBERLE, A.N., DE GRAAN, P.N., SCIMONELLI, T. & SOLCA, F. (1989) Photoaffinity labeling of melanocyte-stimulating hormone receptors. *Pharmacol. & Ther.* **44**: 63-83
- ECKARDT, K., THRUM, N., BRADLER, G., TONEW, E. & TONEW, M. (1975) Streptovirudins, new antibiotics with antibacterial and antiviral activity. II. Isolation, chemical characterization and biological activity of streptovirudins. *J. Antibiot.* **28**: 274-279
- EL BATTARI, A., FORGET, P., FOUCHIER, F. & PIC, P. (1991) Effect of inhibiting N-glycosylation or oligosaccharide processing on vasoactive intestinal peptide receptor binding activity and structure. *Biochem. J.* **278**: 527-533
- ELBEIN, A.D. (1984) Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *Crit. Rev. Biochem.* **16**: 21-49
- ESCHER, E., NGUYEN, T.M.D., GUILLEMETTE, G. & REGOLI, D. (1978) Specific and irreversible block of the myotropic action of angiotensin. *Nature (London)* **275**: 145-146
- ESCHER, E. (1988) Photoaffinity labeling of angiotensin II and bradikinin receptors. *Pharmacol. and Ther.* **37**: 37-55

- FAURE, M., VOYNO-YASENETSKAYA, T.A. & BOURNE, H.R. (1994) cAMP and beta-gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 7851-7854
- FENG, Y.-H., NODA, K., SAAD, Y., LIU, X.-P., HUSAIN, A. & KARNIK, S.S. (1995) The docking of Arg² of angiotensin II with Asp²⁸¹ of AT₁ receptor is essential for full agonism. *J. Biol. Chem.* **270**: 12846-12850
- FIEDLER, K. & SIMONS, K. (1995) The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* **81**: 309-312
- FISHER, T., THOMAS, B., SCHEURICH, P. & PFIZENMAINER, K. (1990) Glycosylation of the interferon-gamma receptor. *J. Biol. Chem.* **265**: 1710-1717
- FONG, T.M., YU, H., HUANG, R.-R.C. & STRADER, C.D. (1992a) The extracellular domain of the neurokinin-1 receptor is required for high-affinity binding of peptides. *Biochemistry* **31**: 11806-11811
- FONG, T.M., HUANG, R.-R.C. & STRADER, C.D. (1992b) Localization of agonist and antagonist binding domains of the human neurokinin-1 receptor. *J. Biol. Chem.* **267**: 25664-25667
- FONG, T.M., CASCIERI, M.A., YU, H., BASAL, A., SWAIN, C. & STRADER, C.D. (1993) Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokinin-1 receptor and CP 96345. *Nature (London)* **362**: 350-353

- GABEL, C.A. & KORNFELD, S. (1984) Targeting of beta-glucuronidase to lysosomes in mannose 6-phosphate receptor-deficient MOPC 315 cells. *J. Cell. Biol.* **99**: 296-305
- GAMOU, S. & SHIMIZU, N. (1988) Glycosylation of the epidermal growth factor receptor and its relationship to membrane transport and ligand binding. *J. Biochem.* **104**: 388-396
- GARCIA, P.D. & MYERS, R.M. (1994) Pituitary cell line GH3 expresses two somatostatin receptor subtypes that inhibit adenylyl cyclase: Functional expression of rat somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human embryonic kidney 293 cells. *Mol. Pharmacol.* **45**: 402-409
- GARCÍA RODRÍGUEZ, C., CUNDELL, D.R., TUOMANEN, E.I., KOLAKOWSKI JR, L.F., GERARD, C. & GERARD, N.P. (1995) The role of N-glycosylation for functional expression of the human platelet-activating factor receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 25178-25184
- GERSZTEN, R.E., CHEN, J., ISHII, M., ISHII, K., WANG, L., NANEVICZ, T., TURCK, C.W., VU, T.K. & COUGHLIN, S.R. (1994) Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature (London)* **368**: 648-651
- GETHER, U., JOHANSEN, T.E., SNIDER, R.M., LOWE III, J.A., NAKANISHI, S. & SCHWARTZ, T.W. (1993) Different binding epitopes on the NK₁ receptor for substance P and a non-peptide antagonist. *Nature (London)* **362**: 345-348

- GETHER, U., LOWE, J.A. & SCHWARTZ, T.W. (1995) Tachykinin non-peptide antagonists: domain and molecular mode of action. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 96-102
- GIASSON, E. & MELOCHE, S. (1995) Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 5225-5231
- GOLDWASSER, E., KUNG, C.K.-H. & ELIASON, J. (1974) On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J. Biol. Chem.* **249**: 4202-4206
- GOOCHEE, C.F., GRAMER, M.J., ANDERSEN, D.C., BAHR, J.B. & RASMUSSEN, J.R. The oligosaccharides of glycoproteins: Factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties. Dans P. Todd, S.K. Sikdar & M. Bier (Eds): *Frontiers in bioprocessing II*. American Chemical Society, Washington, D.C. (1992) p. 199-240
- GRADY, E.F., SECHI, L.A., GRIFFIN, C.A., SCHAMBELAN, M. & KALINYAK, J.E. (1991) Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.* **88**: 921-933
- GRIENDLING, K.K., LASSEGUE, B., MURPHY, T.J. & ALEXANDER, R.W. (1994) Angiotensin II receptor pharmacology. *Adv. Pharmacol.* **28**: 269-306
- GRIGORIADIS, D.E., NIZNIK, H.B., JARVIE, K.R. & SEEMAN, P. (1988) Glycoprotein nature of D₂ dopamine receptors. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **227**: 220-224

- GROBLEWSKI, T., MAIGRET, B., NOUET, S., LARGUIER, R., LOMBARD, C., BONNAFOUS, J.-C. & MARIE, J. (1995) Amino acids of the third transmembrane domain of the AT_{1a} angiotensin II receptor are involved in the differential recognition of peptide and nonpeptide ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 153-160
- GUILLEMETTE, G. & ESCHER, E. (1983) Analysis of the adrenal angiotensin II receptor with the photoaffinity labeling method. *Biochemistry* **22**: 5591-5596
- GUILLEMETTE, G., GUILLON, G., MARIE, J., BALESTRE, M.-N., ESCHER, E. & JARD, S. (1986) High yield photoaffinity labeling of angiotensin II receptors. *Mol. Pharmacol.* **30**: 544-551
- HABERL, R.L., DECKER, P.J. & EINHAUPL, K.M. (1991) Angiotensin degradation products mediate endothelium-dependent dilatation of rabbit brain arterioles. *Circ. Res.* **68**: 1621-1627
- HADCOCK, J.R., STRNAD, J. & EPPLER, C.M. (1994) Rat somatostatin receptor type 1 couples to G proteins and inhibition of cyclic AMP accumulation. *Mol. Pharmacol.* **45**: 410-416
- HARDING, J.W., COOK, V.I., MILLER-WING, A.V., HANESWORTH, J.M., HALL, K.L., STOBBS, J.W., SWANSON, G.N., COLEMAN, J.K.M., WRIGHT, J.W. & HARDING, E.C. (1992) Identification of an AngII(3-8) [AIV] binding site in guinea pig hippocampus. *Brain Res.* **583**: 340-343
- HAZUM, E (1983) Photoaffinity labeling of peptide hormone receptors. *Endocrinol. Rev.* **4**: 352-362

- HEIN, L., BARSH, G.S., PRATT, R.E., DZAU, V.J. & KOBILKA, B.K. (1995) Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature (London)* **377**: 744-747
- HENDERSON, R., BALDWIN, J.M., CESKA, T.A., ZEMLIN, F., BECKMANN, E. & DOWNING, K.H. (1990) Model of the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**: 899-929
- HERBLIN, W.F., CHIU, A.T., MC CALL, D.E., ARDECKY, R.J. & CARINI, D.J. (1991) Angiotensin II receptor heterogeneity. *Am. J. Hypertension* **4**: S299-S302
- HERLITZE, S., GARCIA, D.E., MACKIE, K., HILLE, B., SCHEUER, T. & CATTERALL, W.A. (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein beta-gamma subunits. *Nature (London)* **380**: 258-262
- HJORTH, S.A., SCHAMBYE, H.T., GREENLEE, W.J. & SCHWARTZ, T.W. (1994) Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT₁ receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 30953-30959
- HOBART, P.M., FOGLIANO, M., O'CONNOR, B.A., SCHAEFER, I.M. & CHIRGWIN, J.M. (1984) Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5026-5030
- HOE, M.H. & HUNT, R.C. (1992) Loss of one asparagine-linked oligosaccharide from human transferrin receptors results in specific cleavage and association with the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **267**: 4916-4923

- HOWL, J. & WHEATLEY, M. (1996) Molecular recognition of peptide and non-peptide ligands by the extracellular domains of neurohypophysial hormone receptors. *Biochem. J.* **317**: 577-582
- HUANG, R.-R.C., YU, H., STRADER, C.D. & FONG, T.M. (1994a) Localization of the ligand binding site of the neurokinin-1 receptor: interpretation of chimeric mutations and single-residue substitution. *Mol. Pharmacol.* **45**: 690-695
- HUANG, R.-R.C., YU, H., STRADER, C.D. & FONG, T.M. (1994b) Interaction of substance-P with the second and the seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry* **33**: 3007-3013
- HUNT, R.C., RIEGLER, R. & DAVIS, A.A. (1989) Changes in glycosylation alter the affinity of the human transferrin receptor for its ligand. *J. Biol. Chem.* **264**: 9643-9648
- HUNYADY, L., BALLA, T. & CATT, K.J. (1996) The ligand binding site of the angiotensin AT₁ receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**: 135-140
- HUSAIN, A. (1993) The chymase-angiotensin system in human. *J. Hypertension* **11**: 1155-1159
- ICHIKI, T., LABOSKY, P.A., SHIOTA, C., OKUYAMA, S., IMAGAWA, Y., FOGO, A., NIIMURA, F., ICHIKAWA, I., HOGAN, B.L.M. & INAGAMI, T. (1995) Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature (London)* **277**: 748-750

- IKEDA, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta-gamma subunits. *Nature (London)* **380**: 255-258
- INNAMORATI, G., SADEGHI, H. & BIRNBAUMER, M. (1996) A fully active nonglycosylated V₂ vasopressin receptor. *Mol Pharmacol.* **50**: 467-473
- INSEL, P.A. (1989) Adrenergic receptors. Evolving concepts on structure and function. *Am. J. Hypertension* **2**: S112-S118
- JAISWAL, N., TALLANT, E.A., DIZ, D.I., KHOSLA, M.C. & FERRARIO, C.M. (1991) Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension* **17**: 1115-1120
- JARD, S., CANTAU, B. & JAKOBS, K.H. (1981) Angiotensin II and alpha-adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **256**: 2603-2606
- JARVIE, K.R., NIZNIK, H.B. & SEEMAN, P. (1988) Dopamine D₂ receptor binding subunits of M_r = 140,000 and 94,000 in brain: deglycosylation yeilds a common unit of M_r = 44 000. *Mol. Pharmacol.* **34**: 91-97
- JI, H., LEUNG, M., ZHANG, Y., CATT, K.J. & SANDBERG, K. (1994) Differential structural requirements for specific binding of non-peptide and peptide antagonists to AT₁ angiotensin receptor. Identification of amino acid residues that determine binding of the antihypertensive drug losartan. *J. Biol. Chem.* **269**: 16533-16536

- JI, I. & JI, T.H. (1991) . Human choriogonadotropin binds to a lutropin receptor with essentially no N-terminal extension and stimulates cAMP synthesis. *J. Biol. Chem.* **266**: 13076-13079.
- JIANG, Q., VAN RHEE, A.M., KIM, J., YEHLE, S., WESS, J. & JACOBSON, K.A. (1996) Hydrophilic side chains in the third and seventh transmembrane helical domains of human A_{2a} adenosine receptors are required for ligand recognition. *Mol. Pharmacol.* **50**: 512-521.
- KAGE, R., LEEMAN, S.E., KRAUSE, J.E., COSTELLO, C.E. & BOYD, N.D. (1996) Identification of methionine as the site of covalent attachment of a p-benzoyl-phenylalanine-containing analogue of substance P on the substance P (NK-1) receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 25797-25800
- KAMBAYASHI, Y., BARDHAN, S., TAKAHASHI, K., TSUZUKI, S., INUI, H., HAMAKUBO, T. & INAGAMI, T. (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* **268**: 24543-24546
- KANG, J., SUMNERS, C. & POSNER, P. (1992) Modulation of net outward current in cultured neurons by angiotensin II: involvement of AT₁ and AT₂ receptors. *Brain Res.* **580**: 317-324
- KANG, J., POSNER, P. & SUMNERS, C. (1994) Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am. J. Physiol.* **267**: C1389-C1397

- KAUPMANN, K., BRUNS, C., RAULF, F., WEBER, H., MATTES, H. & LUBBERT, H. (1995) Two amino acids, located in transmembrane domain VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. *EMBO J.* **14**: 727-735
- KAUSHAL, S., RIDGE, K.D. & KHORANA, H.G. (1994) Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 4024-4028
- KENIG, M. & READING, C. (1979) Holomycin and an antibiotic (mm19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.* **32**: 549-554
- KENNEDY, A.P., MANGUM, K.C., LINDEN, J. & WELLS, J.N. (1996) Covalent modification of transmembrane span III of the A₁ adenosine receptor with an antagonist photoaffinity probe. *Mol. Pharmacol.* **50**: 789-798
- KEUTMANN, H.T., JOHNSON, L. & RYAN, R.J. (1985) Evidence for a conformational change in deglycosylated glycoprotein hormones. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **185**: 333-338
- KHORANA, H.G. (1992) Rhodopsin, photoreceptor of the rod cell. An emerging pattern for structure and function. *J. Biol. Chem.* **267**: 1-4
- KIM, S.J., SHINJO, M., FUKAMIZU, A., MIYASAKI, H., USUKI, S. & MURAKAMI, K. (1987) Identification of renin and renin messenger RNA sequence in rat ovary and uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**: 169-175

- KIM, J.H., WESS, J., VAN RHEE, A.M., SCHONEBERG, T. & JACOBSON, K.A.
(1995) Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A_{2a} adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 13987-13997
- KIM, J., JIANG, Q., GLASHOFER, M., YEHLE, S., WESS, J. & JACOBSON, K.A.
(1996) Glutamate residues in the second extracellular loop of the human A_{2a} adenosine receptor are required for ligand recognition. *Mol. Pharmacol.* **49**: 683-691
- KLEE, C.B. (1988) Ca²⁺ dependent phospholipid - (and membrane) - binding proteins. *Biochemistry* **27**: 6645-6653
- KLOTZ, K.-N. & LOHSE, M.J. (1986) The glycoprotein nature of A₁ adenosine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**: 406-413
- KOBILKA, B. (1992) Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* **15**: 87-114
- KOJRO, E., EICH, P., GIMPL, G. & FAHRENHOLZ, F. (1993) Direct identification of an extracellular agonist binding site in the renal V₂ vasopressin receptor. *Biochemistry* **32**: 13537-13544
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S. Assembly of asparagin-linked oligosaccharides. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 631-664

- LATRONICO, A.C., ANASTI, J., ARNHOLD, I.J.P., RAPAPORT, R., MENDONCA, B.B., BLOISE, W., CASTRO, M., TSIGO, C. & CHROUSOS, G.P. (1996) Testicular and ovarian resistance to luteinizing-hormone caused by inactivating mutation of the luteinizing hormone-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* **334**: 507-512
- LAZARD, D., VILLAGEOIS, P., BRIEND-SUTREN, M.M., CAVAILLE, F., BOTTARI, S., STROSBURG, A.D. & NAHMIAS, C. (1994) Characterization of a membrane glycoprotein having pharmacological and biochemical properties of an AT₂ angiotensin II receptor from human myometrium. *Eur. J. Biochem.* **220**: 919-926
- LEDUC, I., HADDAD, P., GIASSON, E. & MELOCHE, S. (1995) Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **48**: 582-592
- LEMANSKY P., GIESELMANN, V., HASILIK, A. & VON FIGURA, K. (1984) Cathepsin D and beta-hexosaminidase synthesized in the presence of 1-deoxynojirimycin accumulate in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **259**: 10129-10135
- LERNER, D.J., CHEN, M., TRAM, T. & COUGHLIN, S.R. (1996) Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J. Biol. Chem.* **271**: 13943-13947
- LEUNG, K.H., SMITH, R.D., TIMMERMAN, P.B.M.W.M. & CHIU, A.T. (1991) Regional distribution of the two angiotensin II receptors in the rat brain using selective nonpeptide antagonists. *Neurosci. Lett.* **123**: 95-98

- LEUNG, K.H., ROSCOE, W.A., SMITH, R.D., TIMMERMANS, P.B.M.W.M. & CHIU, A.T. (1992) Characterization of biochemical responses of angiotensin II (AT₂) binding sites in the rat pheochromocytoma PC12W cells. *Eur. J. Pharmacol.* **227**: 63-70
- LI, Y.-M., MARNERAKIS, M., STIMSON, E.R. & MAGGIO, J.E. (1995) Mapping peptide-binding domains of the substance P (NK-1) receptor from P388D₁ cells with photolabile agonists. *J. Biol. Chem.* **270**: 1213-1220
- LIAPAKIS, G., FITZPATRICK, D., HOEGER, C., RIVIER, J., VANDLEN, R. & REISINE, T. (1996) Identification of ligand binding determinants in the somatostatin receptor subtypes 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **271**: 20331-20339
- LIU, X., DAVIS, D. & SEGALOFF, D.L. (1993) Disruption of potential sites for N-linked glycosylation does not impair hormone binding to the lutropin/choriogonadotropin receptor if Asn-173 is left intact. *J. Biol. Chem.* **268**: 1513-1516
- LODISH, H.F., KONG, N., SNIDER, M. & STROUS, G.J.A.M. (1983) Hepatoma secretory proteins migrate from the rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates. *Nature (London)* **304**: 80-83
- LODISH, H.F. & KONG, N. (1984) Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoprotein from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J. Cell. Biol.* **98**: 1720-1729

- LOKUTA, A.J., COOPER, C., GAA, S.T., WANG, H.E. & ROGERS, T.B. (1994) Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 4832-4838
- LOPEZ, J.J., LORELL, B.H., INGELFINGER, J.R., WEINBERG, E.O., SCHUNKERT, H., DIAMANT, D. & TANG, S.S. (1994) Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁- and AT₂ receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am. J. Physiol.* **267**: H844-H852
- LUTTRELL, L.M., VAN BIESEN, T., HAWES, B.E., KOCH, W.J., TOUHARA, K. & LEFKOWITZ, R.J. (1995) G beta-gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 16495-16498
- MAHONEY, W.C. & DUKSIN D. (1979) Biological activities of the two major components of tunicamycin. *J. Biol. Chem.* **254**: 6572-6576
- MANGELSDORF SODERQUIST, A. & CARPENTER, G. (1984) Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 Cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 12586-12594
- MARIE, J., MAIGRET, B., JOSEPH, M.P., LARGUIER, R., NOUET, S., LOMBARD, C. & BONNAFOUS, J.C. (1994) Tyr-292 in the seventh transmembrane domain of the AT_{1A} angiotensin II receptor is essential for its coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **269**: 20815-20818

- MARRERO, M.B., SCHIEFFER, B., PAXTON, W.G., HEERDT, L., BERK, B.C., DELAFONTAINE, P. & BERNSTEIN, K.E. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature (London)* **375**: 247-250
- MELIKIAN, H.E., RAMAMOORTHY, S., TATE, C.G. & BLAKELY, R.D. (1996) Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduces protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recognition. *Mol. Pharmacol* **50**: 266-276
- MERLIE, J.P. & SMITH, M.M. (1986) Synthesis and assembly of acetylcholine receptor, a multisubunit membrane glycoprotein. *J. Membr. Biol.* **91**: 1-10
- METZDER, T.G. & FERGURSON, D.M. (1995) On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* **375**: 1-4
- MINEGISHI, T., DEGALDO, C. & DUFAU, M.L. (1989) Phosphorylation and glycosylation of the luteinizing hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 1470-1474
- MIZANO, M., SHIMOJIMA, Y., SUGAWARA, T. & TAKEDA, I. (1971) An antibiotic 24010. *J. Antibiot.* **24**: 896-899
- MONNOT, C., BIHOREAU, C., CONCHON, S., CURNOW, K.M., CORVOL, P. & CLAUSER, E. (1996) Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. *J. Biol. Chem.* **271**: 1507-1513

- MONTREUIL, J. (1984) Spatial conformation of glycan and glycoproteins. *Biol. Cell* **51**: 115-132
- MOYLE, W.R., BERNARD, M.P., MYERS, R.V., MARKO, O.M. & STRADER, C.D. (1991) Lutropin/ β -adrenergic receptor chimeras bind choriogonadotropin and adrenergic ligands but are not expressed at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **266**: 10807-10812
- MUKOYAMA, M., NAKAJIMA, M., HORIUCHI, M., SASAMURA, H., PRATT, R.E. & DZAU, V.J. (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* **268**: 24539-24542
- MURAKAMI, E., EGGENA, P., BARRETT, J.D. & SAMBKI, M.P. (1984) Heterogeneity of renin substrate released from hepatocyte and brain extracts. *Life Sci.* **34**: 385-392
- MURPHY, T.J., ALEXANDER, R.W., GRIENDLING, K.K., RUNGE, M.S. & BERNSTEIN, K.E. (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature (London)* **351**: 233-236
- NAGAYAMA, Y., WADSWORTH, H.L., CHAZENBALK, G.D., RUSSO, D., SETO, P. & RAPOPORT, B. (1991) Thyrotropin-luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor extracellular domain chimeras as probes for thyrotropin receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 902-905

- NAHMIAS, C., CAZAUBON, S.M., BRIEND-SUTREN, M.M., LAZARD, D., VILLAGEOIS, P. & STROSBURG, A.D. (1995) Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **306**: 87-92
- NAKAJIMA, M., MUKOYAMA, M., PRATT, R.E., HORIUCHI, M. & DZAU, V.J. (1993) Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 393-399
- NAKAJIMA, M., HUTCHINSON, H.G., FUJINAGA, M., HAYASHIDA, W., MORISHITA, R., ZHANG, L., HORIUCHI, M., PRATT, R.E. & DZAU, V.J. (1995) The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10663-10667
- NAKANISHI, K., KHANG, H., LERRO, K.A., TAKEKUMA, S., YAMAMOTO, T., LIEN, T.H., SASTRY, L., BAEK, D.J., MOQUIN-PATTEY, C. & BOEHM, M.F. (1995) Photoaffinity labeling of rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biophys. Chem.* **56**: 13-22
- NASJLETTI, A. & MASSON, G.M.C. (1971) Hepatic origin of renin substrate. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **49**: 931-932
- NATRARAJAN, R., STERN, N., HSUEH, W., DO, Y. & NADLER, J. (1988) Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II mediated aldosterone biosynthesis in human adrenal glomerulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**: 584-591

- NISHIZUKA, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature (London)* **334**: 661-665
- NODA, K., SAAD, Y. & KARNIK, S.S. (1995) Interaction of Phe⁸ angiotensin II with Lys¹⁹⁹ and His²⁵⁶ of AT₁ receptor in agonist activation. *J. Biol. Chem.* **270**: 28511-28514
- OH, B.-H., PANDIT, J., KANG, C.-H., NIKAIDO, K., GOKCEN, S., AMES, G. & KIM, S.-H. (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without ligand. *J. Biol. Chem.* **268**: 11348-11355
- O'HARA, P., SHEPPARD, P.O., THOGERSEN, H., VENEZIA, D., HALDERMAN, B.A., MC GRANE, V., HOUAMED, K.M., GILBERT, T.L. & MULVIHILL, E.R. (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**: 41-52
- OHKUBO, H., NAKAYAMA, K., TANAKA, T. & NAKANISHI, S. (1986) Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J. Biol. Chem.* **261**: 319-323
- OHYAMA, K., YAMANO, Y., SANO, T., NAKAGOMI, Y., HAMAKUBO, T., MORISHIMA, I. & INAGAMI, T. (1995) Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type 1A. *Regul. Peptide* **57**: 141-147

- OLDEN, K., PRATT, R.M. & YAMADA, K.M. (1979) Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci* **76**: 3343-3347
- OLSON, T.S., BAMBERGER, M.J. & LANE, M.D. (1988) Post-translational changes in tertiary and quaternary structure of the insulin proreceptor. *J. Biol Chem.* **263**: 7342-7351
- OSTROWSKI, J., KJELSBURG, M.A., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. (1992) Mutagenesis of the β_2 -adrenergic receptor: how structure elucidates function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**: 167-183
- PAGE, I.H. & HELMER, O.M. (1940) A crystalline pressor substance (angiotensin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.* **71**: 29-42
- PAREKH, R.B., TSE, A.G.D., DWEK, R.A., WILLIAMS, A.F. & RADEMACHER, T.W. (1987) Tissue-specific N-glycosylation, site-specific oligosaccharide patterns and lentil recognition of rat Thy-1. *EMBO J* **6**: 1233-1244
- PAREKH, R.B., DWEK, R.A., THOMAS, J.R., OPDENAKKER, G., RADEMACHER, T.W., WITTWER, A.J., HOWARD, S.C., NELSON, R., SIEGEL, N.R., JENNINGS, M.G., HARAKAS, N.K. & FEDER, J. (1989) Cell-type specific and site-specific N-glycosylation of the type-1 and type-2 human tissue plasminogen activators. *Biochemistry* **28**: 7644-7662
- PAREKH, R.B. (1991a) Effects of glycosylation on protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**: 750-754

- PAREKH, R.B. (1991b) Mammalian cell gene expression: protein glycosylation. *Curr. Opin. Biotech.* **2**: 730-734
- PAULSON, J.C. (1989) Glycoproteins: what are the sugar chains for?. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 272-276
- PEACH, M.J. (1981) Molecular actions of angiotensin. *Biochem. Pharmacol.* **80**: 2745-2751
- PIERSEN, C.E., TRUE, C.D. & WELLS, J.N. (1994) A carboxyl-terminally truncated mutant and nonglycosylated A2a adenosine receptors retains ligand binding. *Mol. Pharmacol.* **45**: 861-870
- PLATZ, M.S. (1995) Comparison of phenylcarbene and phenylnitrene. *Acc. Chem. Res.* **28**: 487-492
- PRATT, R.E. & DZAU, V.J. Molecular and cellular biology of the renin-mediated growth of the cardiovascular system. Dans M.K. Raizada, M.I. Phillips & C. Sumners (Eds): *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*. Boca Raton: CRC Press, Inc. (1993) p. 471-483
- PROBST, W.C., SNYDER, L.A., SCHUSTER, D.I., BROSIUS, J. & SEALFON, S.C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* **11**: 1-20

- PUCCELL, A.G., HODGES, J.C., SEN, I., BUMPUS, F.M. & HUSAIN, A. (1991)
Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type-2 angiotensin receptor.
Endocrinology **128**: 1947-1959
- QUEHENBERGER, O., PROSSNITZ, E.R., CAVANAGH, S.L., COCHRANE, C.G.
& YE, R.D. (1993) Multiple domains of the N-formyl peptide receptor are required for
high affinity ligand binding. *J. Biol. Chem.* **268**: 18167-18175
- RANDS, E., CANDELORE, M.R., CHEUNG, A.H., HILL, W.S., STRADER, C.D. &
DIXON, R.A.F. (1990) Mutational analysis of β -adrenergic receptor glycosylation. *J.*
Biol. Chem. **265**: 10759-10764
- REGOLI, D., PARK, W.K. & RIOUX, F. (1974) Pharmacology of angiotensin.
Pharmacol. Rev. **26**: 69-123
- RENS-DOMIANO, S. & REISINE, T. (1991) Structural analysis and functional role of
the carbohydrate component of somatostatin receptors. *J. Biol. Chem.* **266**: 20094-
20102
- RONNETT, G.V. & LANE, M.D. (1981) Post-translational glycosylation-induced
activation of aglycoinsulin receptor accumulated during tunicamycin treatment. *J. Biol.*
Chem. **256**: 4704-4707
- RONNETT, G.V., KNUTSON, V.P., KOHANSKI, R.A., SIMPSON, T.L. & LANE,
M.D. (1984) Role of glycosylation in the processing of newly translated insulin
proreceptor in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **259**: 4566-4575

- RICHOUX, J.P., CORDONNIER, J.L., BOUHNİK, J., CLAUSER, E., CORVOL, P., MENARD, J. & GRIGNON, G. (1983) Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res.* **233**: 439-451**
- RUAT, M., TRAIFFORT, E., BOUTHENET, M.L., SOUIL, E., POLLARD, H., MOREAU, J., SCHWARTZ, J.-C., MARTINEZ-MIR, I., PALACIOS, J.M. & HIRSCHFELD, J. (1991) Reversible and irreversible labelling of H1- and H2-receptors using novel [125I] probes. *Agents & Actions* **33**: 123-144**
- SADOSHIMA, J.-I. & IZUMO, S. (1996) The heterotrimeric Gq protein-coupled angiotensin II receptor activates p21ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J.* **15**: 775-787**
- SASAKI, K., YAMANO, Y., BARDHAN, S., IWAI, N., MURRAY, J.J., HASEGAWA, M., MATSUDA, Y. & INAGAMI, T. (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature (London)* **351**: 230-233**
- SASAMURA, H., HEIN, L., KRIEGER, J.E., PRATT, R.E., KOBILKA, B.K. & DZAU, V.J. (1992) Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 253-259**
- SAVARESE, T.M. & FRASER, C.M. (1992) In vivo mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **283**: 1-19**

- SCHAMBYE, H.T., HJORTH, S.A., BERGSMA, D.J., SATHE, G. & SCHWARZ, T.W. (1994) Differentiation between binding sites for angiotensin II and non-peptide antagonists on the angiotensin II type 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 7046-7050
- SHELLING, P., FISCHER, H. & GANTEN, D. (1991) Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?. *J. Hypertension* **9**: 3-15
- SCHWARZ, R.T. & DATEMA, R. (1982) Inhibition of the dolichol pathway of protein glycosylation. *Methods Enzymol.* **83**: 432-443
- SEABROOK, G.R., KEMP, J.A., FREEDMAN, S.B., PATEL, S. SINCLAIR, H.A. & MCALLISTER, G. (1994) Functional expression of human D3 dopamine receptors in differentiated neuroblastoma x glioma NG108-15 cells. *Brit. J. Pharmacol.* **111**: 391-393
- SERVANT, M., GIASSON, E. & MELOCHE, S. (1996) Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 16047-16052
- SIBLEY, C.H. & WAGNER, R.A. (1981) Glycosylation is not required for membrane localization or secretion of IgM in a mouse β -cell lymphoma. *J. Immunol.* **126**: 1868-1873
- SLIEKER, L.J. & LANE, M.D. (1985) Post-translational processing of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **260**: 687-690

- SLIEKER, L.J., MARTENSEN, T.M. & LANE, M.D. (1986) Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 15233-15241
- SOKOLOFF, P., GIROS, B., MARTRES, M.-P., BOUTHENET, M.-L. & SCHWARTZ, J.-C. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature (London)* **347**:146-151
- SOKOLOVSKY, M. (1987) Photoaffinity labeling of muscarinic receptors. *Pharmacol. and Ther.* **32**: 287-302
- SPETH, R.C. & KIM, K.H. (1990) Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine⁶ angiotensin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**: 997-1006
- SRAMEK, S.J., WALLOW, I.H.L., TEWKSBURY, D.A., BRANDT, C.R. & POULSEN, G.L. (1992) An ocular renin-angiotensin system. *Inves. Ophthal. Visual Sci.* **33**: 1627-1632
- STERN-BACH, Y., BETTLER, B., HARTLEY, M., SHEPPARD, P.O., O'HARA, P.J. & HEINEMANN, S.F. (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains related to bacterial amino acid-binding protein. *Neuron*. **13**: 1345-1357
- STILES, G.L. (1985) Deglycosylated mammalian β_2 -adrenergic receptors: effect on radioligand binding and peptide mapping. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**: 65-71

- STILES, G.L., BENOVIC, J.L., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. (1984) Mammalian β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **259**: 8655- 8663
- STOLL, M., STECKELINGS, M., PAUL, M., BOTTARI, S.P., METZGER, R. & UNGER, T. (1995) The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **95**: 651-657
- STRADER, C.D., SIGAL, I.S., REGISTER, R.B., CANDELORE, M.R., RANDS, E. & DIXON, R.A.F. (1987) Identification of residues required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 4384-4388
- STRADER, C.D., CANDELORE, M.R., HILL, W.S., SIGAL, I.S. & DIXON, R.A.F. (1989) Identification of two serine residues involved in agonist activation of beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**: 13572-13578
- STRADER, C.D., MING FONG, T., TOTA, M.R. & UNDERWOOD, D. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 101-132
- SUMNERS, C., TANG, W., ZELEZNA, B. & RAIZADA, M.K. (1991) Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neurons and astrocytes from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7567-7571
- SWANSON, G., HANESWORTH, J.M., SARDINIA, M.F., COLEMAN, J.K.M., WRIGHT, J.W., HALL, K.L., MILLER-WING, A.V., STOBBS, J.W., COOK, V.I., HARDING, E.C. & HARDING, J.W. (1992) Discovery of a distinct binding site for angiotensin II(3-8), a putative angiotensin IV. *Reg. Pept.* **40**: 409-419

- TALLANT, E.A., DIZ, D.I., KHOSLA, M.C. & FERRARIO, C.M. (1991) Identification and regulation of angiotensin II receptor subtypes on NG108-15 cells. *Hypertension* **17**: 1135-1143
- TANABE, Y., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R. & NAKANISHI, S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**: 169-179
- TANAKA, M., OHNISHI, J., OZAWA, Y., SUGIMOTO, M., USUKI, S., NARUSE, M., MURAKAMI, K. & MIYAZAKI, H. (1995) Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**: 593-598
- TARENTINO, A.L., GOMEZ, C.M. & PLUMMER JR, T.H. (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycan by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**: 4665-4671
- TAYLOR, A.K. & WALL, R. (1988) Selective removal of alpha heavy-chain glycosylation sites causes immunoglobulin A degradation and reduced secretion. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4197-4203
- TEWKSBURY, D.A. (1983) Angiotensinogen. *Fed. Proc.* **42**: 2724-2728
- THOMAS, D.D. & STRYER, L. (1982) Transverse location of the retinal chromophore of rhodopsin in rod outer segment disc membranes. *J. Mol. Biol.* **154**: 145-157
- TIFFT, C.J., PROIA, R.L. & CAMERINI-OTERO, D. (1992) The folding and cell surface expression of CD4 requires glycosylation. *J. Biol. Chem.* **267**: 3268-3273

TIMMERMANS, P.B.M.W.M., WONG, P.C., CHIU, A.T., HERBLIN, W.F., BENFIELD, P., CARINI, D.J., LEE, R.J., WEXLER, R.R., SAYE, J.A.M. & SMITH, R.D. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**: 205-251

TKACZ, J.S. & WONG, A. (1978) Comparison of the biological and chemical properties of tunicamycin and mycosporidin. *Fed. Proc.* **37**: 1766-1773

TSUDA, E., KAWANISHI, G., UEDA, M., MASUDA, S. & SASAKI, R. (1990) The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.* **188**: 405-411

TSUDA, T., KAWAHARA, Y., SHII, K., KOIDE, M., ISHIDA, Y. & YOKOYAMA, M. (1991) Vasoconstrictor-induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **285**: 44-48

TSUTSUMI, K. & SAAVEDRA, J.M. (1991) Heterogeneity of angiotensin II AT₂ receptors in the rat brain. *Mol. Pharmacol.* **41**: 290-297

TSUZUKI, S., ICHIKI, T., NAKAKUBO, H., KITAMI, Y., GUO, D.-F., SHIRAI, H. & INAGAMI, T. (1994) Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1449-1454

UNGER, T., GOHLKE, P., PAUL, M., & RETTIG, R. (1991) Tissue renin-angiotensin system: fact or fiction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **18**: S20-S25

- UTSUMI, J., YAMASAKI, S., HOSOI, K., KIMURA, S., HANADA, K., SHIMAZU, T. & SHIMIZU, H. (1987) Characterization of E.coli-derived recombinant human interferon-beta as compared with human fibroblast interferon-beta. *J. Biochem.* **101**: 1199-1208
- VALIQUETTE, M., VU, H.K., YUE, S.Y., WAHLESTEDT, C. & WALKER, P. (1996) Involvement of Trp-284, Val-296, and Val-297 of the human delta-opioid receptor in binding of delta-selective ligands. *J. Biol. Chem.* **271**: 18789-18796
- VALLOTTON, M.B. (1987) The renin angiotensin system. *Trends Pharmacol. Sci.* **8**: 69-74
- VAN KOPPEN, C.J. & NATHANSON, N.M. (1990) Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **265**: 20887-20892
- VISWANATHAN, M., TSUTSUMI, K., CORREA, F.M.A. & SAAVEDRA, J.M. (1991) Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 1361-1367
- VISWANATHAN, M. & SAAVEDRA, J.M. (1992) Expression of angiotensin II AT₂ receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides* **13**: 783-786
- WALKER, P., MUNOZ, M., MARTINEZ R. & PEITSCH, M.C. (1994) Acidic residues in extracellular loops of the human Y1 neuropeptide Y receptor are essential for ligand binding. *J. Biol. Chem.* **269**: 2863-2869

- WANG, F.-F.C. & HIRS, C.H.W. (1977) Influence of the heterosaccharides in porcine pancreatic ribonuclease on the conformation and stability of the protein. *J. Biol. Chem.* **252**: 8358-8364
- WEBB, M.L., LIU, E.C.K., COHEN, R.B., HEDBERG, A., BOGOSIAN, E.A., MONSHIZADEGAN, H., MOLLOY, C., SERAFINO, R., MOCELAND, S., MURPHY, T.J. & DICKINSON, K.E.J. (1992) Molecular characterization of angiotensin II type II receptors in rat pheochromocytoma cells. *Peptide* **13**: 499-508
- WHITEBREAD, S., MELE, M., KAMBER, B. & DE GASPARO, M. (1989) Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**: 284-291
- WILLIAMS, A.M. & ENNS, C.A. (1991) A mutated transferrin receptor lacking asparagine-linked glycosylation sites shows reduced functionality and association with binding immunoglobulin protein. *J. Biol. Chem.* **266**: 17648-17654
- YAMADA, T., HORIUCHI, M. & DZAU, V.J. (1996) Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 156-160
- YAMANO, Y., OHYAMA, K., CHAKI, S., GUO, D.-F. & INAGAMI, T. (1992) Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**: 1426-1431

- YAMANO, Y., OHYAMA, K., KIKYO, M., SANO, T., NAKAGOMI, Y., INOUE, Y., NAKAMURA, N., MORISHIMA, I., GUO, D.-F., HAMAKUBO, T. & INAGAMI, T. (1995) Mutagenesis and molecular modeling of the rat angiotensin II receptor (AT₁). *J. Biol. Chem.* **270**: 14024-14030
- YE, M.Q. & HEALY, D.P. (1992) Characterization of an angiotensin type-1 receptor partial cDNA from rat kidney: evidence for a novel AT_{1B} receptor subtype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 204-210
- YET, M.-G., SHAO, M.-C. & WOLD, F. (1988) Effects of the protein matrix on glycan processing in glycoprotein. *FASEB J.* **2**: 22-31
- YET, M.-G. & WOLD, F. (1990) The distribution of glycan structures in individual N-glycosylation sites in animal and plant glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**: 356-364
- YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., KOYAMA, N., SHIOKAWA, S., NANNO, T. & NAKAMURA, Y. (1992) Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett.* **307**: 305-308
- YOSHIMURA, Y., KOYAMA, N., KARUBE, M., ODA, T., AKIBA, M., YOSHINAGA, A., SHIOKAWA, S., JINNO, M. & NAKAMURA, Y. (1994) Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. *J. Clin. Invest.* **93**: 180-187

- YOSHIMURA, Y., KARUBE, M., AOKI, H., ODA, T., KOYAMA, N., NAGAI, A., AKIMOTO, Y., HIRANO, H. & NAKAMURA, Y. (1996) Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT₂ receptor subtype. *Endocrinology* **137**: 1204-1211
- ZHANG, J. & PRATT, R.E. (1996) The AT₂ receptor selectively associates with Gi2 and Gi3 in the rat fetus. *J. Biol. Chem.* **271**: 15026-15033
- ZHANG, R., TSAI-MORRIS, C.H., KITAMURA, M., BUCZKO, E. & DUFAU, M.L. (1991) Changes in binding activity of luteinizing hormone receptors by site directed mutagenesis of potential glycosylation sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 804-808